

СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 4, 2020

Аминокислоты как регуляторы метаболизма клетки (обзор) <i>С.В. Нестеров, Л.С. Ягузинский, Г.И. Подопригора, Я.Р. Нарциссов</i>	459
Каталитическая субъединица РКА как прототип семейства эукариотических протеинкиназ (обзор) <i>Б.А. Рейхардт, П.Д. Шабанов</i>	476
Транслезионный синтез ДНК и канцерогенез (обзор) <i>Е.С. Шилкин, Е.О. Болдинова, А.Д. Столяренко, Р.И. Гончарова, Р.Н. Чупров-Неточин, Р.Ф. Хайруллин, М.П. Смаль, А.В. Макарова</i>	494
Обзор механизмов действия цитокина Tgf β 3 как терапевтического агента для увеличения синтеза внеклеточного матрикса гиалинового хряща (обзор) <i>М.С. Божокин, Ю.В. Сопова, Д.В. Качкин, А.А. Рубель, М.Г. Хотин</i>	507
Белковый комплекс NDC80: свойства, функции и возможная роль в патофизиологии клеточного деления (обзор) <i>Н.Б. Устинов, А.В. Коршунова, Н.Б. Гудимчук</i>	521
Субстратное разнообразие гомологов дегидрогеназы L-треоновой кислоты <i>Ч. Чжан, Юй Лю, С. У, С. Чжан, Х. Хуан</i>	537
Высокий уровень транскрипции гена на стадии эмбриона приводит к подавлению его гетерохроматиновой транс-инактивации у взрослых особей <i>Drosophila melanogaster</i> <i>А.А. Солодовников, В.А. Гвоздев, С.А. Лавров</i>	547
Определение сравнительной активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований в клеточных экстрактах <i>О.А. Кладова, Д.А. Яковлев, Р. Гроисман, А.А. Ищенко, М.К. Сапарбаев, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов</i>	556
Анализ траектории образования промежуточного гликозилфермента в механизме действия нейраминидазы вируса гриппа А методами молекулярного моделирования <i>Е.М. Кирилин, В.К. Швядас</i>	567
Структурная организация и динамические характеристики участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина вируса гриппа H3N2 и H7N9 <i>Д.Д. Подшивалов, Е.М. Кирилин, С.И. Коннов, В.К. Швядас</i>	578
Убаин и маринобуфагенин: возможные физиологические эффекты на клетки эпителия и эндотелия человека <i>Е.А. Климанова, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, П.А. Абрамичева, О.Д. Лопина, С.Н. Орлов</i>	587
Неорганические полифосфаты и особенности физиологии дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при сверхэкспрессии гена <i>PPN2</i> <i>Л.П. Рязанова, Л.А. Ледова, Н.А. Андреева, А.Н. Звонарев, М.А. Эльдаров, Т.В. Кулаковская</i>	598

ХРОНИКА

Знаменательные и юбилейные даты истории биохимии 2020 г.	607
Опечатки	608

CONTENTS

Vol. 85, Publ. 4, 2020

Amino Acids as Metabolic Regulators (Review) <i>S. V. Nesterov, L. S. Yaguzhinsky, G. I. Podoprigora, and Ya. R. Nartsissov</i>	459
Catalytic Subunit of PKA as a Prototype of the Eukaryotic Protein Kinase Family (Review) <i>B. A. Reikhardt and P. D. Shabanov</i>	476
Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis (Review) <i>E. S. Shilkin, E. O. Boldinova, A. D. Stolyarenko, R. I. Goncharova, R. N. Chuprov-Netochin, R. F. Khairullin, M. P. Smal, and A. V. Makarova</i>	494
Evaluation of Tgf β 3 Cytokine Mechanism of Action as a Therapeutic Agent for Increasing Synthesis of Extracellular Matrix Proteins in Hyaline Cartilage (Review) <i>M. S. Bozhokin, Y. V. Sopova, D. V. Kachkin, A. A. Rubel, and M. G. Khotin</i>	507
Protein Complex NDC80: Properties, Functions and Possible Role in Pathophysiology of Cell Division (Review) <i>N. B. Ustinov, A. V. Korshunova, and N. B. Gudimchuk</i>	521
Substrate Diversity of L-Threonic Acid Dehydrogenase Homologs <i>C. F. Zhang, Y. P. Liu, X. X. Wu, X. S. Zhang, and H. Huang</i>	537
The High Level of Gene Transcription at the Embryo Stage Leads to the Suppression of Its Heterochromatic <i>trans</i> -Inactivation in <i>Drosophila melanogaster</i> Adults <i>A. A. Solodovnikov, V. A. Gvozdev, and S. A. Lavrov</i>	547
Measuring the Activity of Base Excision Repair Enzymes in Cellular Extracts Using Fluorescent DNA Probes <i>O. A. Kladova, D. A. Iakovlev, R. Groisman, A. A. Ishchenko, M. K. Saparbaev, O. S. Fedorova, and N. A. Kuznetsov</i>	556
The Pathway Analysis at the Formation of Glycosyl-Enzyme Intermediate in the Catalytic Mechanism of the Influenza A Virus Neuraminidase Using Methods of Molecular Modeling <i>E. M. Kirilin and V. K. Švedas</i>	567
Structural Organization and Dynamic Characteristics of the Binding Site of Conformational Rearrangement Inhibitors of Hemagglutinin from H3N2 and H7N9 Influenza Virus <i>D. D. Podshivalov, E. M. Kirilin, S. I. Konnov, and V. K. Švedas</i>	578
Ouabain and Marinobufagenin: A Possible Physiological Effects on Human Epithelial and Endothelial Cells <i>E. A. Klimanova, D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, P. A. Abramicheva, O. D. Lopina, and S. N. Orlov</i>	587
Inorganic Polyphosphate and the Peculiarities of Physiology under Overexpression of <i>PPN2</i> Gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>L. P. Ryazanova, L. A. Ledova, N. A. Andreeva, A. N. Zvonarev, M. A. Eldarov, and T. V. Kulakovskaya</i>	598

CHRONICLE

Notable and Anniversary Dates in Biochemistry for 2020	607
Errata	608

УДК 577.3

АМИНОКИСЛОТЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ

Обзор

© 2020 С.В. Нестеров^{1,2}, Л.С. Ягужинский^{1,3*}, Г.И. Подопривора¹, Я.Р. Нарциссов¹

¹ НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии,
115404 Москва, Россия; электронная почта: yag@genebee.msu.ru

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

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

Поступила в редакцию 03.10.2019

После доработки 10.02.2020

Принята к публикации 11.02.2020

Обзор посвящён исследованию принципов регуляции и синхронизации процессов метаболизма в клетках млекопитающих. В работе использовали модель двухкомпонентного устройства метаболизма клетки, включающую управляющую сигнальную систему, которая регулирует основные ферментные системы, и исполнительную метаболическую систему, непосредственно осуществляющую биосинтез. Такое рассмотрение позволило выделить два переходных состояния метаболизма (от катаболизма к анаболизму и обратно), в которых происходят основные перестройки в сигнальной системе. Сигнальная система природных аминокислот (АК) выбрана для обзора как наиболее удобный фрагмент общего метаболизма клетки, поскольку АК участвуют и в сигнальной, и исполнительной подсистемах метаболизма. В работе разработан графический способ представления событий, позволивший продемонстрировать последовательность процессов, протекающих в обеих подсистемах метаболизма в ходе прохождения полного метаболического цикла неделяющейся клеткой. Выявлена важная особенность сигнальной системы АК: их сигнальные свойства определяются не только структурой молекулы, но и местом локализации в клетке. Выделены четыре основные сигнальные группы АК, локализованные в лизосомах, митохондриях, цитозоле и внеклеточном пространстве, прилегающем к плазматической мембране. Эти группы АК схожи по составу, но имеют при этом различные рецепторы. Построенная в работе схема системы регуляции метаболизма сигналами АК способна служить базой для разработки более полной пространственно-временной схемы регуляции метаболизма, включающей широкое множество внутриклеточных сигнальных каскадов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аминокислоты, внутриклеточная сигнализация, mTORC1, AMPK, лизосома, катаболизм, анаболизм.

DOI: 10.31857/S0320972520040016

Настоящая работа посвящена исследованию системы синхронизации (в пространстве и времени) биохимических процессов в системе общего метаболизма клетки. Этой проблемой мы начали заниматься ещё на этапе формирования современных представлений о молекулярном устройстве сигнальных систем клетки [1, 2], опираясь, в том числе, на работы Вебера [3–5]. Веберу удалось выделить две антагонистичные группы ферментов, показать синхронную активацию ферментов каждой группы и синхронное переключение между этими двумя группами. Фактически на уровне ферментативных процессов Вебер эмпирически выделил анаболизм и

катаболизм. При анаболизме активны системы синтеза сложных соединений, а при катаболизме преобладают процессы распада.

В данном обзоре метаболизм клетки рассмотрен на основе двухкомпонентной модели, включающей исполнительную метаболическую систему клетки, выполняющую процессы биосинтеза (основа описания этой системы заложена Вебером), и сигнально-управляющую систему, регулирующую работу исполнительной системы. В настоящее время выделение двух основных состояний метаболизма на уровне исполнительных систем уже стало общепринятым. Актуальной научной задачей является расшифровка механизмов функционирования сигнальных систем, которые обеспечивают синхронизацию работы внутри анаболического и катаболического ферментативных кластеров и переключение между ними.

Принятые сокращения: АК – аминокислоты; GAP – белок-активатор ГТФазной активности; GEF – фактор обмена гуаниловых нуклеотидов.

* Адресат для корреспонденции.

Переходы между метаболическими режимами в клетке индуцируются внешними и внутренними сигналами, такими как гормоны (адреналин, глюкагон, инсулин), стрессовые факторы, сигналы внесения и удаления субстратов (сигналы «сытости» и «голода»). Сигнальная система природных АК выбрана для обзора как наиболее удобный фрагмент общего метаболизма клетки, на основе которого можно получить достаточно полную картину, адекватно отражающую устройство и принципы функционирования системы клеточного метаболизма. Такой выбор был сделан потому, что АК органично включены в обе подсистемы метаболизма клетки — и сигнальную, и исполнительную. В соответствии с этим сигналы АК должны прямо или косвенно контролировать очень широкое множество метаболических процессов. В рамках настоящей работы были рассмотрены именно сигналы АК в качестве индукторов перехода от катаболизма к анаболизму и обратно (при дефиците АК). Таким образом, в работе на уровне сигнальной системы показан полный метаболический цикл неделящихся клеток и проведено соответствие между работой сигнальной и исполнительной систем.

Переключение между метаболическими режимами осуществляется как путём быстрого включения и выключения уже существующих ферментов, так и путём регуляции процессов трансляции и транскрипции, необходимых для синтеза новых ферментов. Центральную роль в переносе сигналов играет система *пост*-трансляционной модификации белков. На одном белке под влиянием внешних и внутренних сигналов могут индуцироваться десятки химических модификаций (фосфорилирование, метилирование и др.), которые влияют на конформацию, каталитическую активность и локализацию белка [6]. Взаимосвязанная сеть регуляторных белков, способных к изменению конформации, представляет собой кратковременную («оперативную») память клетки. Именно эта система, в первую очередь, перестраивается в ответ на внешние раздражители, обеспечивает быстрые стрессовые ответы, а также регулирует активность генома за счёт модификации факторов транскрипции.

У эукариот существуют две основные сигнальные системы *пост*-трансляционной модификации белков, управляющие метаболизмом непосредственно по сигналу АК: «SOS-система» интегрального стрессового ответа, переводящая клетку в катаболический режим при дефиците хотя бы одной АК (активируется киназой GCN2), и система регуляции, связанная с mTORC1, которая при условии полноты набора

АК и наличия других необходимых для роста факторов активирует анаболизм. Существенное влияние оказывают сигналы АК также на АМФ-зависимую киназу (AMPK) и NAD⁺-зависимую деацетилазу Sirt1. Два последних фермента являются активаторами кластера катаболических процессов. Все вышеперечисленные белковые регуляторные системы (или их аналоги) присутствуют во всех эукариотических клетках, независимо от тканевой специфичности в многоклеточных организмах. Таким образом, именно эти ключевые метаболические регуляторы служат центральной частью системы управления метаболизмом. Необходимо отметить, что для полного представления о метаболизме отдельных типов клеток нужно учитывать также видо- и ткане-специфичные сигнальные каскады, как связанные с аминокислотами (например, сигналы от глутаматного и глицинового рецепторов на плазматических мембранах некоторых клеток), так и иной природы (сигналы от рецепторов гормонов, цитокинов и иных сигнальных молекул).

В обзоре разработана схема графического представления последовательности событий в сигнальной и исполнительной системах неделящихся эукариотических клеток в процессе полного метаболического цикла.

Список и минимальное описание функций основных белков, которые были использованы при построении схем сигнально-метаболической системы, связанной с аминокислотами, дано в табл. 1. Более подробное описание интересных белков и их сигналов можно найти в соответствующих ссылках. Таблица может использоваться вместо списка сокращений, а также для лучшего понимания представленных далее схем.

ЦЕНТР УПРАВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМОМ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИЗОСОМ

Данные последних лет показывают, что главный сигнальный центр метаболического контроля расположен на внешней поверхности мембраны лизосом [39–41]. При этом ключевым звеном в сигнальных каскадах АК является димер малых ГТФаз Rag, который расположен на белковом комплексе Ragulator, закоренном на внешней поверхности лизосомы посредством ковалентной сшивки с жирной кислотой [18], а также за счёт взаимодействия с вакуолярной АТФазой (vATPase) [21]. Комплекс vATPase-Ragulator-Rag является структурной платформой, на которую в разных метаболических режимах происходит посадка ключевых регуляторных белков: протеинкиназы AMPK при ка-

таболизме [19]; протеинкиназы PERK при стрессовом ответе [42]; митоген-активируемой протеинкиназы ERK [18] по сигналу факторов роста; протеинкиназы mTORC1 и некоторых её мишеней по сигналу АК [43]. Белковый комплекс vATPase-Ragulator-Rag, контролирующий посадку и активацию этих протеинкиназ, получил в некоторых работах название «нутрисома» [44–46].

Малые ГТФазы, в том числе Rag и Rheb, являются ГТФ-удерживающими белками и сами по себе обладают слабо выраженной гидролитической активностью. Эти ГТФазы осуществляют гидролиз ГТФ только при воздействии специальных белков GAP. Для RagA и RagB ГТФаз таким активирующим белком является белковый комплекс GATOR1, для RagC – комплекс FLCN/FNIP, для RagD – LRS, для Rheb – белковый комплекс TSC–TBC (см. табл. 1). Прямое взаимодействие с этими белками фактически ингибирует передачу сигнала соответствующими ГТФазами, переводя их в неактивную ГДФ-связанную форму. Последующее возобновление сигнальной активности ГТФаз происходит с помощью других белков (GEF), стимулирующих обмен ГДФ на ГТФ. Для Rag – это Ragulator, для Rheb – регуляторный белок пока не установлен.

В последние несколько лет появилось большое число работ по рентгеноструктурному анализу и криоэлектронной микроскопии, в которых исследуется структура белковых компонент АК-регуляции, связанных с mTORC1 (подробнее см. обзор [47]). Были установлены структуры АК-связывающих белков Sestrin2 [26] и CAS-TOR [28], АК транспортёра–рецептора SLC38A9 [48]. Недавно была расшифрована структура пентамерного комплекса Ragulator вместе с закреплёнными фрагментами Rag ГТФаз [49–52], показаны также структуры ключевых посредников в каскадах передачи сигналов АК – комплекса GATOR1, присоединённого к Rag ГТФадам [22], ГТФазы Rheb [53], вакуолярной АТФазы [54, 55]. В нескольких работах расшифрована структура самого комплекса mTORC1 [14, 56, 57], которая показала его функционирование в составе димера и позволила установить место связывания активирующей его ГТФазы Rheb. Используя вышеприведённые новейшие структурные данные работы [21] о контактах Ragulator с vATPase, а также того, что комплекс Ragulator и ГТФаза Rheb заякорены в лизосомальной мембране [58], мы составили приближённую структуру белкового суперкомплекса на лизосомальной мембране, на котором закреплён mTORC1 (рис. 1). Эта реконструкция является наглядной иллюстрацией структурного устройства ключевого звена системы синхронизации метаболизма.

Наша схема хорошо согласуется с другими подобными реконструкциями, вышедшими в период рецензирования нашего обзора [59, 60], но в отличие от них отображает приблизительное расположение также vATPase и транспортёра SLC38A9, являющегося сенсором лизосомального аргинина.

ЧЕТЫРЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУЛА АК, РАЗЛИЧНЫХ ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКЕ

В настоящей работе показано, что сигнальная система АК, в первую очередь, связана со структурно-функциональными компартментами клетки, такими как плазматическая мембрана (внешняя среда), цитозоль, лизосомы и митохондрии. Возможно, регуляторное значение могут иметь сигналы АК и из других органелл, например, из аппарата Гольджи [61]. Различная локализация АК в клеточных компартментах приводит к их взаимодействию с разными рецепторными белками. Благодаря этому АК, находящиеся в разных компартментах, обладают различными сигнальными свойствами. Тот факт, что специфика сигналов АК определяется не только их структурой, но и локализацией в клетке является важнейшей особенностью этой системы. Как показано в предыдущем разделе, все эти сигналы, так или иначе, сходятся в едином сигнальном центре управления метаболизмом на внешней поверхности мембраны лизосом.

АК с разной локализацией имеют и различное функциональное значение. Внеклеточные АК являются внешним управляющим фактором, под который подстраивается метаболизм клетки. Пул АК в цитозоле используется для синтеза белка и, следовательно, необходим для адаптации клетки к постоянно изменяющимся внешним условиям. АК в матриксе митохондрий активно вовлечены в метаболизм: в зависимости от условий в митохондриях происходит распад или синтез АК (заменимых), а также реализуются начальные звенья биосинтеза многих сложных органических соединений. Лизосомальный пул АК прямо не вовлечён в процессы биосинтеза и является внутренним резервом клетки, который посредством транспортёров может быть транспортирован в цитозоль и митохондрии. АК в лизосомах появляются в основном за счёт эндоцитоза и протеолиза белков в процессе аутофагии.

Необходимо указать, что в каждом компартменте основные сигналы индуцируются приблизительно одним и тем же набором АК: лейцином, глутамином, аргинином и метионином.

Таблица 1. Список основных белков, связанных с системой АК сигнализации

Белок	Краткое описание роли в системе сигнализации
mTORC1 комплекс 1 киназы mTOR (механистической мишени рапамицина)	активирует систему трансляции и несколько факторов транскрипции, стимулирующих синтез ферментов биосинтеза, инактивирует факторы аутофагии и транскрипции лизосомальных белков [7]
AMPK АМФ активируемая киназа	активирует факторы аутофагии и факторы транскрипции, отвечающие за экспрессию лизосомальных и митохондриальных белков; активирует АМФ и Ca^{2+} при дефиците незаменимых АК [8]
Sirt1 NAD^+ -зависимая деацетилаза	активирует AMPK и ряд других клеточных систем антистрессовой защиты, препятствует воспалению [9, 10]; связывание лейцина с Sirt1 усиливает его сродство к NAD^+ [11]
GCN2 киназа общего контроля с постоянной репрессией 2	активируется в цитозоле при связывании со свободными тРНК, а также иными путями [12]; фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF-2, что препятствует посадке рибосом на мРНК и индуцирует интегральный стрессовый ответ [13]
Rheb малая ГТФаза	в ГТФ-связанной форме при присоединении к mTORC1 включает его фосфорилирующую активность [14]; помимо mTORC1 регулирует и другие сигнальные каскады, причём в разных органеллах [15]
TSC-TBC комплекс из белков TSC1, TSC2, TBC1D7	является GAP для Rheb [16]; активируется многими стрессовыми сигналами, в том числе киназой AMPK; теряет активность при фосфорилировании протеинкиназой Akt (PKB), которая активируется по сигналу инсулина
Rag A, B, C, D малые ГТФазы	существуют в форме димеров: A или B связана с C или D [17]; димеры удерживаются на поверхности лизосом с помощью комплекса Ragulator и обладают способностью связывать mTORC1, если RagA или Rag B связаны с ГТФ
Ragulator (образовано от слов Rag regulator), он же LAMTOR	адапторный белковый пентамерный комплекс на поздних эндосомах или лизосомах, на котором происходит активация митоген-активируемой киназы ERK [18], mTORC1 и AMPK [19]; при взаимодействии с некоторыми транспортёрами АК и vATPase выполняет роль GEF для RagA и B ГТФаз [20]
vATPase вакуолярная АТФаза	протонный насос: закисляет полость лизосом за счёт энергии гидролиза АТФ; взаимодействует с комплексом Ragulator и транспортёрами АК в мембране лизосом [21]; точный механизм участия в активации mTORC1 не установлен, однако без способной к вращению vATPase mTORC1 не может быть активирован
GATOR1	устойчивый комплекс из трёх белков (Depdc5, Nprl2, Nprl3), являющийся GAP для RagA и B [22]; по сигналу АК его активность регулируется связыванием с ним белков SAMTOR и GATOR2
SAMTOR сенсор SAM (S-аденозил-метионина)	при недостатке метионина (в несвязанной с SAM форме) связан с GATOR1 (с Depdc5 субъединицей), что усиливает GAP активность GATOR1 по отношению к RagA и B; при связывании с SAM отсоединяется от GATOR1, что ослабляет его связь с RagA и B [23]
GATOR2	пентамерный белковый комплекс; ингибирует GATOR1, связываясь с его Depdc5 субъединицей [22]
Sestrin2 стресс-индуцируемый белок, цитоплазматический сенсор лейцина	при недостатке АК в цитоплазме образует комплекс с GATOR2 [24], тем самым его ингибируя; присоединение лейцина (а также Ile, Val, Met) [25] разрушает комплекс Sestrin с GATOR2, что позволяет последнему блокировать GATOR1, то есть предотвращать гидролиз ГТФ на RagA и B; кроме этого, Sestrin2 регулирует аутофагию, снижает уровень АФК [26]
CASTOR цитоплазматический сенсор аргинина	стресс-индуцируемый белок; в каскаде mTORC1 действует аналогично Sestrin2: комплекс CASTOR с GATOR2 распадается при связывании CASTOR с аргинином [27, 28]
FLCN фолликулин	в каскаде активации mTORC1 функционирует в комплексе с белком FNIP и является GAP для RagC [29]; связывается с Rag при отсоединении GATOR1 [30]; является регулятором активности AMPK [31], также регулирует транспорт лизосом в клетке [32]

Окончание таблицы 1

Белок	Краткое описание роли в системе сигнализации
LRS лейцил-тРНК синтетаза	содержит в структуре специальный домен, который при связывании LRS с лейцином, но в отсутствие связанной тРНК, проявляет GAP-активность по отношению к Rag D [33]
Vps34 киназа фосфатидилинозитола класса 3	регулирует широкий спектр мембранно-связанных процессов, включая везикулярный транспорт, эндоцитоз и аутофагию; по сигналу АК стимулирует активность фосфолипазы D и способствует деактивации TSC–TBC [34]
PLD1 фосфолипаза D1	образует фосфатидную кислоту (PA) из глицерофосфолипидов; PA связывается с mTORC1 и вызывает отсоединение от него ингибиторных белков [35, 36]
PIKfyve фосфоинозитид киназа	образует фосфотидил инозитол бифосфат PI(3,5)P2 из монофосфата PI(3)P [37]
TRPML1 кальциевый канал в лизосомальной мембране	активируется PI(3,5)P2, обеспечивает выход кальция из полости лизосом и активацию кальций-зависимых процессов в окрестности лизосомальной мембраны [37]
GDH глутаматдегидрогеназа	при связывании лейцина ускоряет расщепление глутамата митохондриями; в результате повышается концентрация α -кетоглутарата, необходимого для функционирования пролил-гидроксилаз, без работы которых невозможна активация mTORC1 [38]

Тот факт, что именно эти АК используются клетками в качестве сигнальных, по-видимому, определяется эволюционным развитием рецепторно-сигнальной системы, которая реагирует лишь на самые важные для клетки сигналы. Лейцин является существенно гидрофобной АК, формирующей основу для альфа-спиралей белков, что делает его ключевой частью интегральных белков и одной из самых распространённых АК. Лейцин является неглюкогенной АК, не задерживается печенью, в связи с чем его концентрация в крови после приёма пищи меняется в большей степени, чем большинства АК [62], что делает лейцин индикатором поступления с пищей белка (незаменимых АК). Метионин является незаменимой серосодержащей АК и служит как донором серы для синтеза другой серосодержащей АК – цистеина (ключевой АК при фолдинге белков), так и является основным донором метильных групп (в форме *s*-аденозил-метионина). Реакция метилирования является второй по интенсивности (после фосфорилирования) в клетках, что делает контроль уровня метионина критически важным. Кроме того, значительная часть биологических эффектов метионина вызвана непосредственным влиянием на скорость реакций метилирования и не требует дополнительных сигнальных белков. Глутамин и аргинин, хотя и являются заменимыми АК, не менее важны для клетки. Глутамин является временным депо азота в митохондриях, а аргинин вовлечён в цикл мочевины. Эти АК также влияют на процессы транспорта неза-

менимых АК из внеклеточной среды [63] и лизосом [64] в цитозоль. Таким образом, эти две заменимые АК помимо важной роли в структуре белков являются показателями катаболизма АК и возможности транспорта незаменимых АК. При этом клетка, благодаря наличию системы интегрального стрессового ответа, всё же чувствительна к падению концентрации и любой другой протеиногенной АК, что позволяет оперативно остановить процесс трансляции при их дефиците [65]. Этого механизма, по-видимому, достаточно, чтобы обеспечить функционирование клетки, а развитие сенсорной системы, специфически реагирующей на каждую АК, привело бы лишь к необоснованному усложнению сигнальной системы, что невыгодно для организма в условиях естественного отбора.

ЦИКЛЫ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ КАТАБОЛИЗМ–АНАБОЛИЗМ

Анализ процессов сигнализации АК и транспорта АК позволяет определить чёткую хронологическую последовательность действия АК на ключевые метаболические регуляторы mTORC1 и AMPK в процессе перехода между режимами катаболизма и анаболизма (рис. 2). Rag ГТФазы при недостатке АК, складывающемся, в частности, при голодании, находятся в «катаболической» форме: Rag B(A)-ГДФ, Rag D(C)-ГТФ [33] (рис. 3, *a* в момент начала отсчёта; рис. 4 блок I). Появление внешних АК и их транспор-

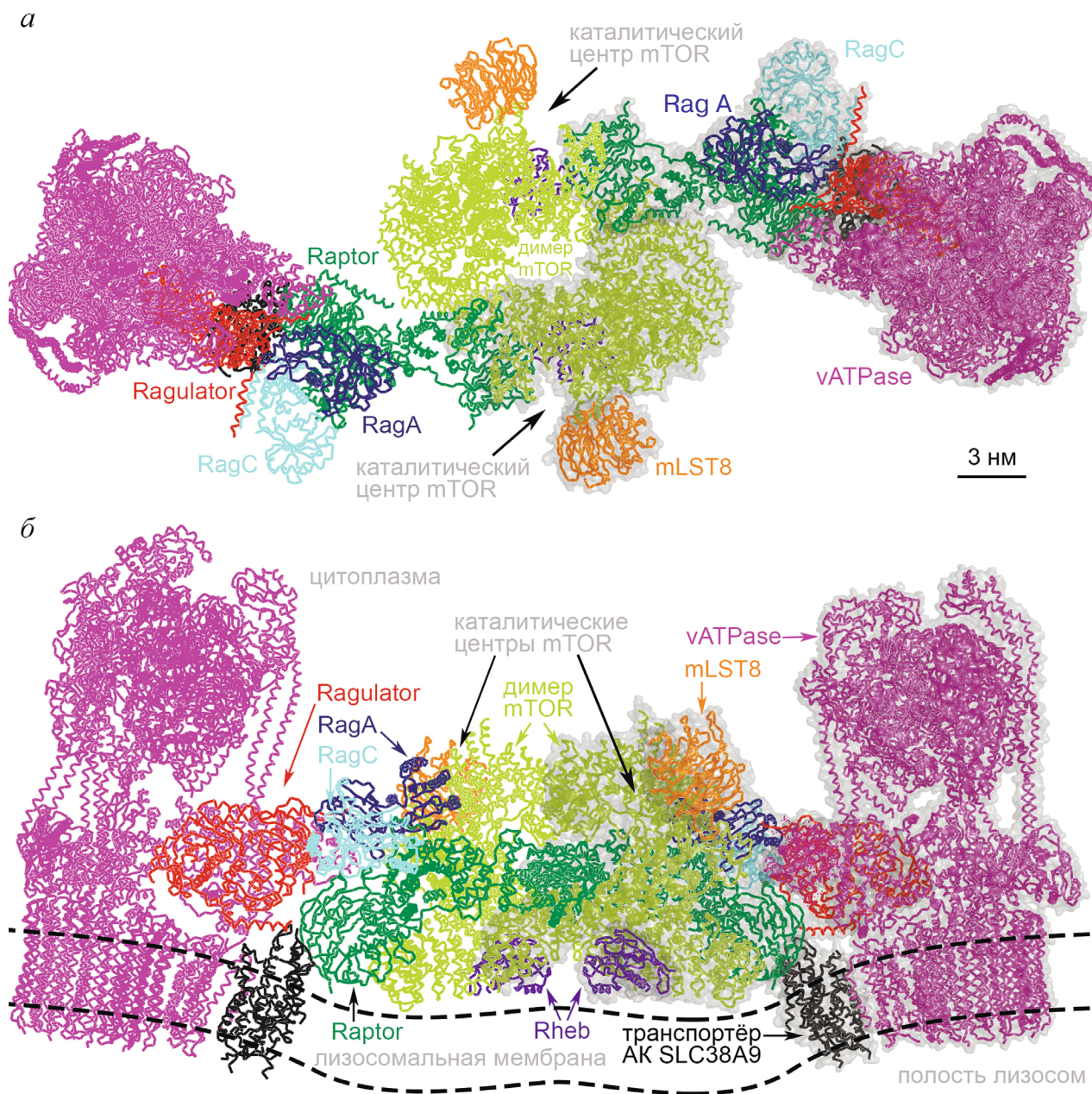


Рис. 1. Реконструкция предположительной структуры места посадки mTORC1 на лизосому (платформы «нутрисома»). *a* – Вид на поверхность лизосомы со стороны цитозоля; *б* – вид на плоскость, перпендикулярную лизосомальной мембране. Пунктиром обозначен возможный контур мембраны лизосом, позволяющий мембранной субъединице vATPase, транспортёру SLC38A9 и жирным кислотам, ковалентно связанным с белками Rheb и Ragulator, находиться в липидном окружении. Первичную визуализацию структуры белков проводили с помощью программы PyMol с использованием структур белкового банка данных 3j9t, 5tj5, 6bcu, 6ehr, 6ces, 6c08, 6U62. Приблизительный докинг проводили по принципу плотной упаковки с использованием установленных методом электронной микроскопии мест связывания отдельных белков, а также описанных в литературе белок-белковых и белок-липидных взаимодействий комплексообразующих белков. Обозначения: mLST8, Raptor, mTOR – субъединицы mTORC1, SLC38A9 – лизосомальный транспортёр незаменимых АК, регулируемый аргинином. Описание остальных белков дано в табл. 1

тировка в цитоплазму индуцирует переход Rag ГТФаз в промежуточное разблокированное состояние (рис. 3, *a*, минуты 1–8; рис. 4, блок II). Эта разблокировка происходит по сигналу цитозольных и митохондриальных АК, которые ак-

тивируют ГТФаз-активирующие белки (GAP) для RagC и D. Только в этом разблокированном состоянии димера Rag возможна посадка ГТФ на RagB(A), которая происходит по сигналу от пула лизосомальных АК (посредством актива-

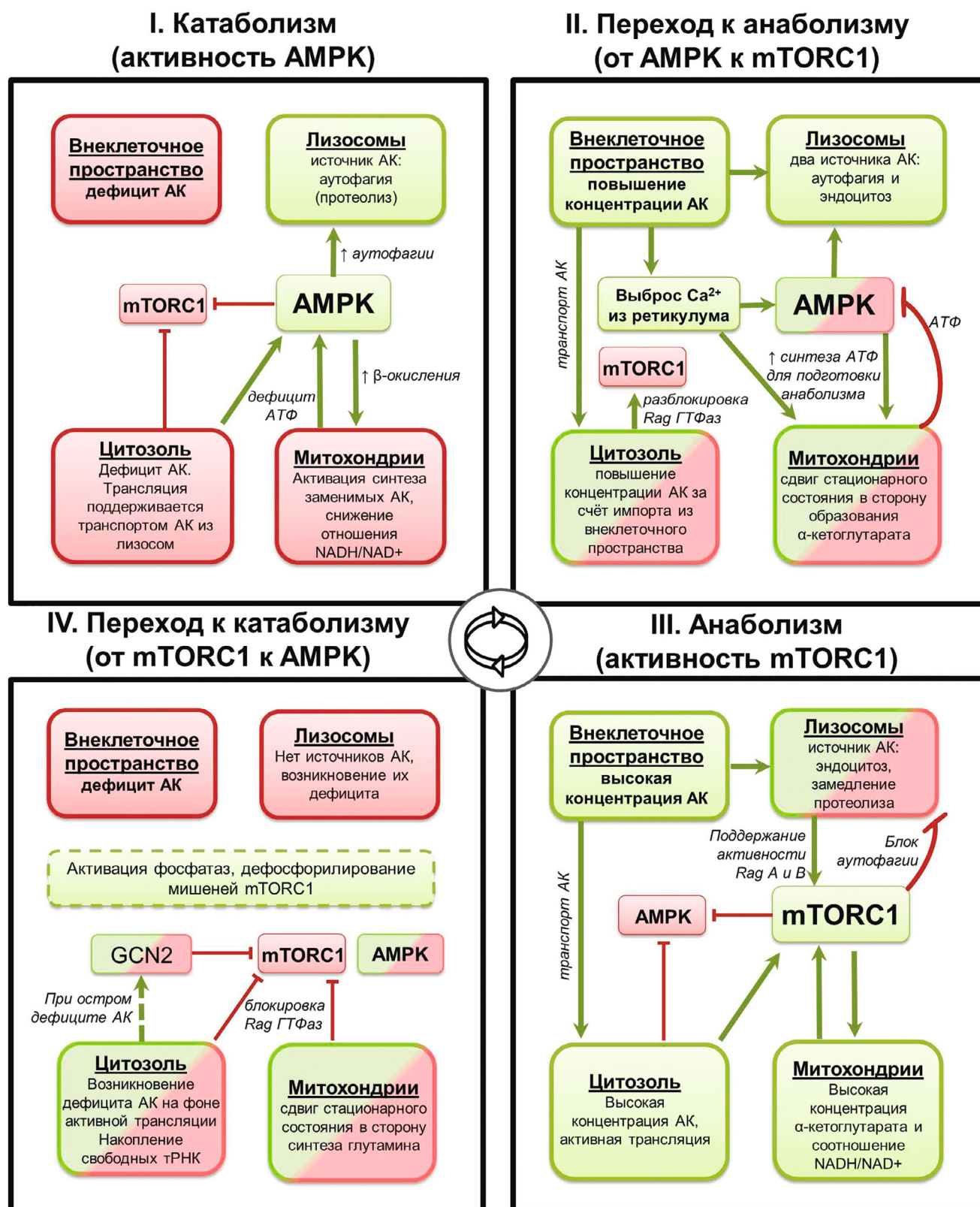


Рис. 2. Схема функционирования сигнальных пулов АК в процессе метаболического цикла. На схеме отображено как изменение в наполненности четырёх основных пулов АК управляет активностью ключевых регуляторов метаболизма (mTORC1 и AMPK) и, тем самым, индуцирует циклический переход от катаболизма к анаболизму и обратно

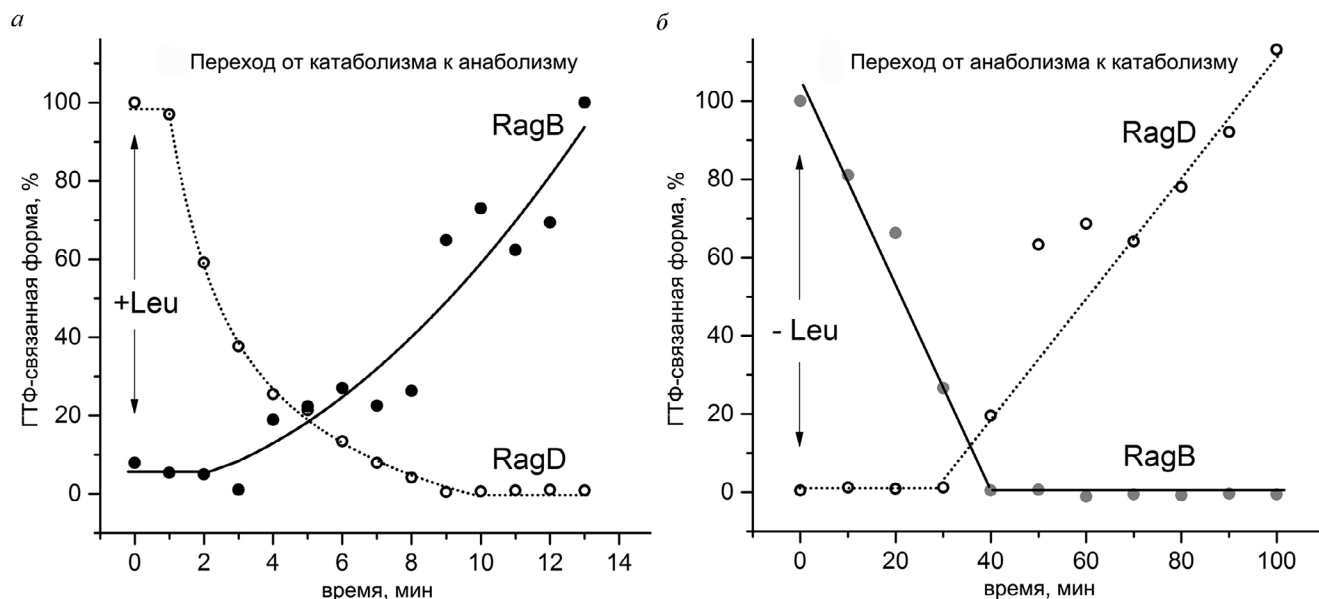


Рис. 3. Изменение ГТФ-связывания Rag ГТФаз (на примере димера RagB с RagD) при переходах катаболизм—анаболизм и анаболизм—катаболизм. Гомологичный димер RagA с RagC претерпевает такие же изменения ГТФ связывания с запаздыванием в несколько минут. Процесс перехода от катаболизма к анаболизму (а) индуцировали добавлением лейцина к клеткам (+Leu), инкубируемым перед этим 90 мин без этой АК. Процесс перехода от анаболизма к катаболизму (б) индуцировали пересадкой клеток в среду, не содержащую лейцин (-Leu). Графики построены по оцифрованным данным работы [33], полученным в экспериментах на клетках рака кишечника человека SW620. Линии на графиках соответствуют сплайн-интерполяции оцифрованных данных

ции комплекса *Regulator*, являющегося фактором обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) для Rag (рис. 3, а, минуты 8–13). Переход димера Rag в «анаболическую» форму (RagB(A)-ГТФ, RagD(C)-ГДФ) является сигналом для посадки *mTORC1* на лизосому [17]. Согласно данным динамической внутриклеточной визуализации [66], активированный димер Rag имеет меньшее сродство к комплексу *Regulator*, в результате чего приобретает способность отсоединяться от лизосомы и начинает циркулировать между мембраной лизосомы и цитозолем. В цитозоле димер Rag связывается с неактивным *mTORC1*, после чего вместе с ним садится на поверхность лизосомы, где *mTORC1* связывается с ГТФазой Rheb и фосфатидной кислотой, переходит в каталитически-активную форму и включает кластер анаболических процессов (рис. 4, блок III). При исчерпании лизосомального и/или цитозольного пула АК, например, в результате ограничения поступления внешних АК, Rag ГТФазы переходят в промежуточное состояние (рис. 3, б, минуты 1–40; рис. 4, блок IV). В этом состоянии должна также происходить активация фосфатаз, вызывающих дефосфорилирование мишеней *mTORC1* (например, фосфатазы PP2A [67]). После стирания «анаболических меток» с сигнальных белков становится возможным переход в катаболический режим. При установившемся

катаболизме димер Rag вновь переходит в «катаболическую» форму (рис. 3, б, минуты 40–100; рис. 4, блок I). Особенность Rag ГТФаз состоит в том, что обе ГТФазы в составе димера одновременно не могут быть связаны с ГТФ, поскольку связывание ГТФ с одной ГТФазой блокирует посадку ГТФ на другую. Данное обстоятельство делает необходимым прохождение через переходное состояние. Это свойство димера Rag подтверждается как структурными данными [68], так и экспериментами по измерению кинетики ГТФ-ГДФ связывания Rag ГТФаз [33] (данные представлены на рис. 3). Необходимо отметить, что приведённые на рис. 3 данные относятся к конкретной культуре клеток, время активации Rag может значительно отличаться в других типах клеток, однако данные литературы позволяют утверждать, что общие принципы сигнализации и качественная картина кинетики активации схожи во всех клетках.

На рис. 2, в основном, отображены изменения в наполненности и сигнальной активности различных пулов АК в процессе циклических переходов клетки между катаболизмом и анаболизмом. На этой схеме, в том числе, упрощённо, отображены основные транспортные и метаболические процессы в клетке в ходе метаболического цикла. Обнаруженные пространственно-временные изменения активности сигнальных

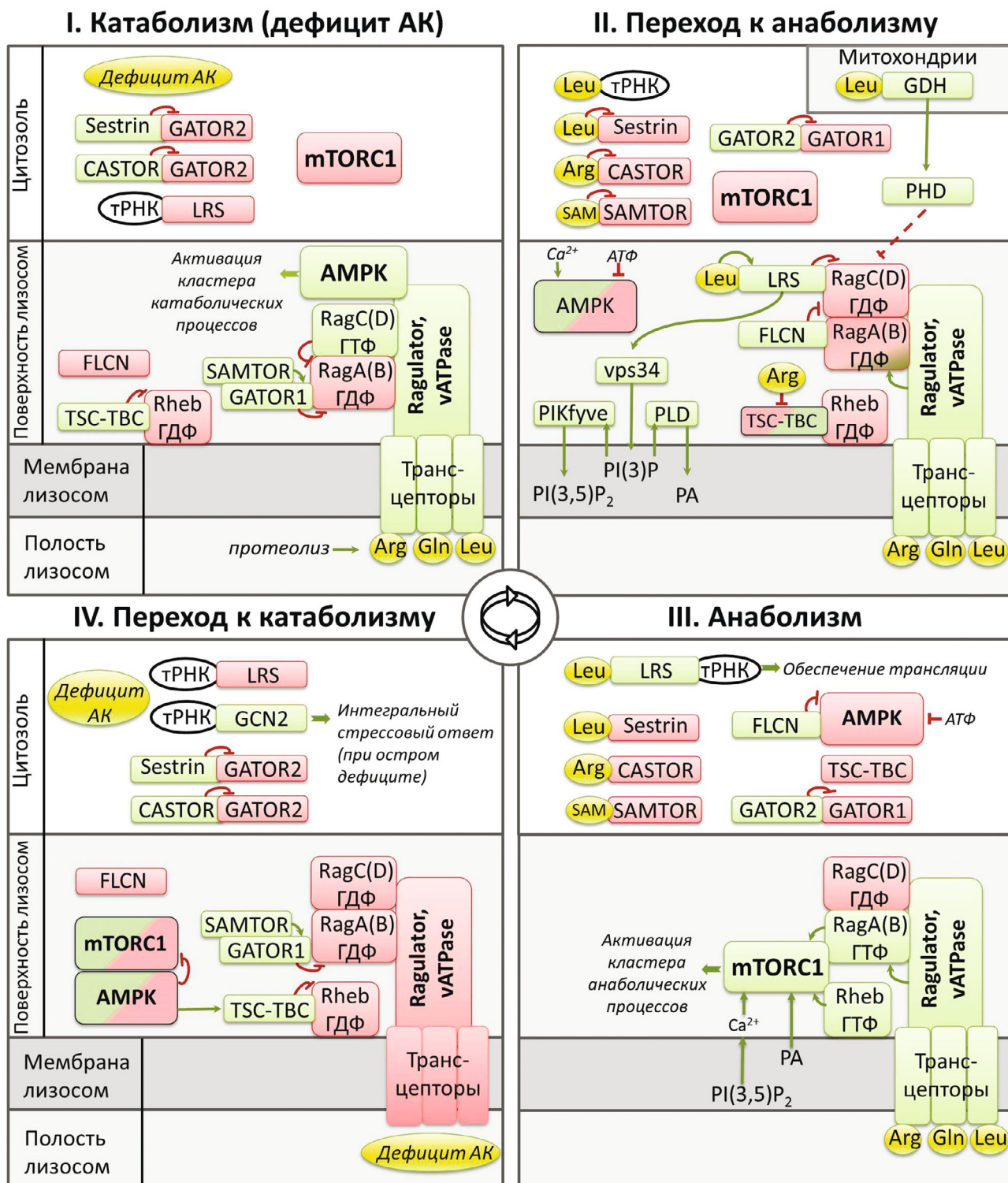


Рис. 4. Молекулярная основа синхронных перестроек метаболизма клетки. Изменения активности белков системы АК сигнализации на основных (I и III) и переходных (II и IV) стадиях метаболического цикла. Зелёным цветом обозначены активные (т.е. передающие сигнал последующим звеньям), а красным – неактивные компоненты сигнальной системы. Двойным цветом обозначены белки, активность которых не однозначна или может претерпевать изменения во временном интервале одной стадии цикла. Физически взаимодействующие белки на схеме также соприкасаются, при этом активирующее воздействие обозначено стрелкой, а подавляющее воздействие обозначено Т-образной линией. Активация для ГТФаз понимается в смысле наличия их сигнальной активности, т.е. активация – это переход в ГТФ-связанную форму, а блокирование – в ГДФ-связанную форму. Краткое описание используемых на схеме белков дано в табл. 1, а последовательность активации описана в табл. 2

Таблица 2. Последовательность активации сигналов различных групп АК в процессе циклического переключения между состояниями катаболизма и анаболизма

Первичный сигнал (взаимодействие АК с рецептором)	Краткое описание механизма сигнального каскада	Влияние на метаболизм/ключевые регуляторы
I. Катаболизм В этом состоянии низкая концентрация АК вне клетки; основной источник АК — аутофагия и протеолиз в лизосомах; из лизосом АК переносятся в цитозоль и митохондрии, где используются для поддержания трансляции или расщепляются		
Белки Sestrin, CASTOR, SAMTOR в цитозоле не связаны с лейцином, аргинином, и s-аденозилметионом соответственно Связывание АК (подробнее описано ниже) из полости лизосом с лизосомальными транспортёрами-рецепторами (транспепторами)	Sestrin [24–26, 71, 72] и CASTOR [27, 28] связаны с GATOR2. SAMTOR [23] связан с GATOR1, стимулируя его GAP-активность по отношению к RagA(B) [22] в этом состоянии RagA и B не могут связывать ГТФ (из-за активности GAP GATOR1), поэтому происходит медленная посадка ГТФ на RagC и D; возможно, этот процесс катализируется Ragulator, который является единственным известным GEF белком для Rag [20]	RagA(B)-ГДФ не позволяет mTORC1 сесть на лизосому; в цитозоле каталитический центр mTORC1 блокирован перевод димера ГТФаз в «заблокированное» состояние предотвращает спонтанную активацию mTORC1; фиксируется состояние катаболизма (преобладает активность AMPK и Sirt1)
II. Переходное состояние катаболизм—анаболизм Индуктируется повышением концентрации внеклеточных АК, попадающих в цитоплазму в результате работы АК-транспортёров и эндоцитоза		
Связывание любой АК из внеклеточной среды с вкусовым рецептором (T1R) на плазматической мембране Связывание незаменимых АК из внеклеточной среды с транспортёрами плазматической мембраны Лейцин в цитозоле связывается с деацетилазой Sirt1 Лейцин связывается с лейцил-тРНК синтетазой (LRS) в условиях дефицита свободных тРНК в цитозоле (на фоне медленного темпа трансляции)	T1R активирует фосфолипазу C, образующую инозитол-3-фосфат, вызывающий выброс кальция из ЭПС [73]; кальций стимулирует работу митохондриальных дегидрогеназ, а также AMPK обмен цитозольного глутамина [63] и аспарагина [75] на внешние незаменимые АК может лимитировать скорость включения анаболизма [76] связывание лейцина увеличивает сродство Sirt1 к NAD ⁺ [11], что позволяет Sirt1 сохранять активность в условиях повышения соотношения NADH/NAD ⁺ связанная с лейцином LRS является GAP для RagD [33, 78] LRS связывается с фосфатидилинозитолкиназой vps34 [79]. Фосфатидилинозитолфосфат (PI(3)P) активирует синтез фосфатидной кислоты (PA) фосфолипазой D. Накопление PA и PI(3)P в мембране препятствует посадке TSC–TBC комплекса на лизосому и тем самым способствует удержанию ГТФазы Rheb в ГТФ форме [34]. PI(3)P подвергается также повторному фосфорилированию с образованием бифосфата PI(3,5)P, который активирует кальциевый канал TRPML1, вызывающий выход кальция из полости лизосом [37]	кальций стимулирует синтез АТФ митохондриями, при этом поддерживая или даже временно усиливая активность AMPK [74]. Активация биоэнергетики и катаболизма даёт клетке ресурс для импорта внешних субстратов и включения анаболизма сформированный митохондриями в катаболическом состоянии пул глутамина поддерживает быстрый транспорт незаменимых АК Sirt1 на первом этапе перехода активирует катаболизм (совместно с AMPK) [9, 77]. Sirt1 также необходим для восстановления трансляции после интегрального стрессового ответа [10] гидролиз ГТФ на RagD ГТФазе снимает запрет на посадку ГТФ на связанную с ней RagB 1. фосфатидная кислота связывается с mTORC1, вызывая диссоциацию его ингибиторных белков [35,36] (разблокировка mTORC1); 2. Rheb-ГТФ активирует mTORC1; 3. кальций-кальмодулин непосредственно связывается с mTORC1 и активирует его; 4. также кальций-кальмодулин активирует фосфатазу кальциневрин (PP2B), которая дефосфорилирует мишени AMPK

Окончание таблицы 2

Первичный сигнал (взаимодействие АК с рецептором)	Краткое описание механизма сигнального каскада	Влияние на метаболизм/ ключевые регуляторы
В цитозоле: 1. Лейцин (также изолейцин и валин) связывается с белком Sestrin 2. Аргинин связывается с белком CASTOR 3. S-аденозил-метионин связывается с белком SAMTOR	связывание АК с Sestrin и CASTOR разрушает их комплекс с GATOR2. GATOR2 связывается с GATOR1 и вытесняет его с RagA(B) [80]. Связывание SAMTOR с s-аденозил-метионином также вытесняет GATOR1 с RagA(B) [23] после отсоединения GATOR1 с RagA связывается комплекс FLCN/FNIP, являющийся GAP для RagC [30]; гидролиз ГТФ на RagC снимает запрет на посадку ГТФ на парную ГТФазу – RagA	переход ведущего димера Rag (RagB с RagD) в промежуточную «разблокированную» форму, из которой возможен переход в «анаболическую» форму, связывающуюся с mTORC1 переход запаздывающего димера Rag (RagA с RagC) в промежуточную «разблокированную» форму, из которой возможен переход в «анаболическую» форму, связывающуюся с mTORC1

III. Анаболизм

В ходе переходного состояния сформировались лизосомальный, митохондриальный и цитозольный пулы АК, которые подают терминальные сигналы на mTORC1

Лейцин связывается с глутамат-дегидрогеназой (GDH) в митохондриях	аллостерическая стимуляция лейцином GDH [81] ускоряет образование альфа-кетоглутарата (αKG) из глутамата и глутамина. αKG стимулирует синтез АТФ и работу пролил-гидроксилаз, влияющих на Rag [82]	1. повышение соотношения NADH/NAD ⁺ и скорости синтеза АТФ блокируют ключевые катаболические регуляторы (Sirt1 и AMPK); 2. пролил-гидроксилазы способствуют посадке mTORC1 на лизосому
Лизосомальные АК связываются с транспортёрами (транспортерами): аргинин связывается с SLC38A9 [64]; лейцин с LAT-1 [83]; глутамин (и, возможно, серин) с PAT-4 [84] (PAT-4 функционирует также в аппарате Гольджи [61]); цистин (димер цистеина) с транспортёром cystinosin [85]	связываемые с соответствующими АК транспортеры образуют комплексы с v-ATPase и Ragulator, что индуцирует посадку ГТФ на RagA и B [86] (предварительно разблокированных при переходном состоянии); присоединение Arg к SLC38A9 также ускоряет опосредованный им транспорт незаменимых АК из лизосомы в цитозоль [64]	сигнал лизосомальных АК индуцирует переход RagA(B) в ГТФ-связанную форму и является окончательным сигналом для посадки mTORC1 на лизосому, где эта протеинкиназа взаимодействует с Rheb-ГТФ и фосфатидной кислотой, активирующими каталитическую активность mTORC1
Лейцил-тРНК синтетаза (LRS) в цитозоле связана и с лейцином, и с тРНК	LRS переходит из режима сигнального белка в режим функционирования в качестве фермента, катализирующего образование лейцил-тРНК [87]	обеспечение высокого темпа трансляции
Заменимые АК (включая аргинин, глутамин) в цитозоле передают сигналы через не идентифицированные рецепторы	стабилизация активной ГТФазы Rheb на лизосоме [88], препятствие её взаимодействию с GAP комплексом TSC–TBC [89]; есть сообщения о Rag-независимой транслокации mTORC1 на лизосому по сигналу глутамина [90]	активный Rheb связывается с mTORC1, включая его каталитическую активность [14]

IV. Переходное состояние анаболизм—катаболизм

Падение уровня АК во внеклеточной среде индуцирует падение уровня АК в цитозоле, лизосомах и митохондриях

Цитозольные белки Sestrin, CASTOR, SAMTOR высвобождаются от связывания с АК и их производными	происходит активация GATOR1, который переводит RagA(B) в ГДФ-связанную форму [33], вызывая диссоциацию mTORC1 с лизосомы	уход mTORC1 с лизосомы, начало процессов дефосфорилирования мишеней mTORC1
Дефицит метионина в цитозоле	недостаток метионина замедляет метилирование и разблокирует фосфатазу PP2A [91, 92]	PP2A дефосфорилирует мишени mTORC1, стимулирует синтез лизосомальных белков [67, 93]
При остром дефиците АК происходит накопление свободных тРНК в цитозоле, которые связываются с киназой GCN2	GCN2 блокирует фактор инициации трансляции eIF-2, что приводит к трансляции с вышестоящих рамок считывания; также блокирует mTORC1 [94, 95]	запуск интегрального стрессового ответа, активация защитных и транспортных систем клетки на уровне транскрипции [65], аутофагии

белков, передающих сигналы от АК на mTORC1 в ходе метаболического цикла, более детально представлены на рис. 4. Обозначенные на рис. 4 промежуточные белковые посредники определяют состояние ГТФаз Rag, обеспечивающих связывание mTORC1 с лизосомой, необходимое для активации этой протеинкиназы. Следует подчеркнуть, что разные сигнальные белки, во-первых, находятся в разных компартментах и, следовательно, связаны с разными метаболическими путями АК, а с другой стороны, именно через посредничество этих «промежуточных» сигнальных белков осуществляется взаимосвязь системы АК сигнализации со всем остальным множеством сигнальных каскадов клетки. Краткое описание перестройки белковых взаимодействий (схемы на рис. 4) в зависимости от изменения концентрации АК в разных компартментах дано в табл. 2.

Особый интерес представляет роль митохондрий в метаболическом цикле. При катаболизме происходит активация AMPK, которая активирует протеолиз в лизосоме, синтез митохондриальных белков и бета-окисление жирных кислот в митохондриях. В условиях катаболизма высокоэффективный синтез АТФ в митохондриях является основным источником энергии в клетке. Последние данные показывают, что без активно функционирующих митохондрий клетки не способны даже поддерживать ключевой катаболический процесс — аутофагию [69]. Важно подчеркнуть, что необходимым фактором для перехода от катаболизма к анаболизму является перестройка метаболизма глутамата в митохондриях под действием аллостерического сигнала лейцина. Присоединение лейцина к GDN обращает процесс синтеза глутамата (преобладающий при катаболизме) в процесс синтеза α -кетоглутарата. Без этого обращения работы фермента, которое экспериментально наблюдается при поступлении внешних АК в митохондрии, невозможен переход Rag ГТФаз в mTORC1-связывающую форму и включение анаболизма [38]. Необходимо отметить, что, наоборот, смещение стационарного состояния в сторону синтеза глутамата является достаточным, чтобы индуцировать катаболизм посредством сигнала из митохондрий [70].

В работе метаболизм клеток млекопитающих рассмотрен как двухкомпонентная система, состоящая из сигнально-командной и исполнительной ферментативной подсистем. Такое рассмотрение позволило достаточно полно описать и графически отобразить последовательность событий, происходящих в ключевых звеньях сигнальной и исполнительной систем клетки при переходах между состояниями катаболизма

и анаболизма. Анализ новейших литературных данных позволил дополнить метаболический цикл Вебера (базирувавшегося только на активности исполнительных систем) двумя промежуточными стадиями, при которых происходит перестройка сигнальной системы и стирание информации, записанной на белках во время основных метаболических стадий.

Построенная нами схема метаболического цикла выполнена на основе сигнальной системы аминокислот. В первую очередь, было проведено сопоставление сигналов АК с активностью ключевых сигнально-метаболических регуляторов, таких как mTORC1 и AMPK (рис. 2 и рис. 4). Для этих протеинкиназ уже известны молекулярные механизмы регуляции, что позволяет по их активности с достаточной точностью прогнозировать состояние исполнительной системы метаболизма. Во-вторых, было показано, что сигнальные свойства АК определяются не только их молекулярной структурой, но и локализацией (рис. 2). Основными компартментами, сигналы АК из которых реализуются на разных стадиях метаболического цикла, являются: внеклеточное примембранное пространство, цитозоль, лизосомы и митохондрии. При этом переход в анаболический режим невозможен без подачи сигналов от всех указанных пулов АК на специальную липидно-белковую платформу на поверхности лизосомы.

Как показал анализ литературы и составленные нами детальные схемы, система аминокислотной регуляции метаболизма оказалась не только необходимой, но и достаточной для обеспечения движения клетки по метаболическому циклу (рис. 4). Таким образом, система АК сигнализации может рассматриваться как стволовая система регуляции метаболизма, а другие типы внешних сигналов (стрессы, гормоны) являются модулирующими, вспомогательными сигналами. Такое рассмотрение логично и с эволюционной точки зрения, так как система АК-сигнализации, близкая по своей структуре к сигнальной системе АК млекопитающих, присутствует и в одноклеточных эукариотах, которые лишены гормональной регуляции.

Сигналы АК не только определяют возможность роста и деления отдельных клеток, но также выполняют адаптогенную роль, являясь необходимыми факторами для быстрого протекания любых стресс-реакций. Наличие согласованной регуляции гомеостаза АК в крови млекопитающих делает АК также неотъемлемой частью механизма синхронизации процессов анаболизма и катаболизма на уровне всего организма за счёт регуляции работы эндокринных клеток [96] и клеток гипоталамуса [97–99]. Активность

mTORC1 также необходима для работы иммунной системы, как на этапе созревания новых иммунных клеток [100], так и на этапе секреции воспалительных цитокинов [101]. Более того, последние данные показывают, что патологическая активность mTORC1 за счёт воздействия на эндотелиальную NO синтазу ведёт к нарушению микроциркуляции [102], что является одной из ключевых причин развития аутокаталитических воспалительных процессов [103]. Учёт этих важнейших сигнальных путей АК позволяет дополнить ранее продемонстрированные эффекты АК на микроциркуляцию [104–106] и найти новые пути коррекции метаболических нарушений, тесно связанных с воспалением. Благодаря тесной взаимосвязи метаболизма и функциональной активности клеток, построенная в работе схема пространственно-временной динамики АК сигнализации открывает путь для поиска новых схем терапии и профилактики заболеваний человека с использованием аминокислот.

Таким образом, построенная в работе схема системы регуляции метаболизма, присутствующая практически во всех клетках млекопитающих, способна служить начальным звеном и точкой роста для более полной пространственной схемы, включающей, помимо сигналов АК, широкое множество других сигнальных каскадов клетки, в том числе, и тканеспецифических.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии и РФФИ (грант 19-04-00835/19).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Смирнова Е. Г., Нижний С. В., Ягужинский Л. С. (1980) Метод определения специфических изменений метаболизма в быстро пролиферирующих тканях, *Изв. АН СССР*, 636–653.
- Смирнова Е. Г., Нижний С. В., Ягужинский Л. С. (1982) Соотношение скоростей метаболических процессов в опухолевых клетках, *Изв. АН СССР*, 499–507.
- Weber, G. (1964) Enzyme regulation in mammalian tissues, *Science*, **146**, 1489–1492, doi: 10.1126/science.146.3650.1489.
- Weber, G., and Singhal, R. L. (1965) Insulin: inducer of phosphofructokinase. The integrative action of insulin at the enzyme biosynthetic level, *Life Sci.*, **4**, 1993–2002.
- Weber, G., Singhal, R. L., and Srivastava, S. K. (1965) Effect of nutritional state on hormonal regulation of liver enzymes, *Can. J. Biochem.*, **43**, 1549–1563.
- Pearce, L. R., Komander, D., and Alessi, D. R. (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 9–22, doi: 10.1038/nrm2822.
- Sabatini, D. M. (2017) Twenty-five years of mTOR: uncovering the link from nutrients to growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11818–11825, doi: 10.1073/pnas.1716173114.
- Herzig, S., and Shaw, R. J. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 121–135, doi: 10.1038/nrm.2017.95.
- Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J. Y., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function, *Cell Metab.*, **15**, 675–690, doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.003.
- Ghosh, H. S., Reizis, B., and Robbins, P. D. (2011) SIRT1 associates with eIF2- α and regulates the cellular stress response, *Sci. Rep.*, **1**, 150, doi: 10.1038/srep00150.
- Liang, C., Curry, B. J., Brown, P. L., and Zemel, M. B. (2014) Leucine modulates mitochondrial biogenesis and SIRT1-AMPK signaling in C2C12 myotubes, *J. Nutr. Metab.*, **2014**, 239750, doi: 10.1155/2014/239750.
- Masson, G. R. (2019) Towards a model of GCN2 activation, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 1481–1488, doi: 10.1042/BST20190331.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A., and Gorman, A. M. (2016) The integrated stress response, *EMBO Rep.*, **17**, 1374–1395, doi: 10.15252/embr.201642195.
- Yang, H., Jiang, X., Li, B., Yang, H. J., Miller, M., Yang, A., Dhar, A., and Pavletich, N. P. (2017) Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40, *Nature*, **552**, 368–373, doi: 10.1038/nature25023.
- Heard, J. J., Fong, V., Bathaie, S. Z., and Tamanoi, F. (2014) Recent progress in the study of the Rheb family GTPases, *Cell. Signal.*, **26**, 1950–1957, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.05.011.
- Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., Finan, P. M., Kwiatkowski, D. J., Murphy, L. O., and Manning, B. D. (2012) TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1, *Mol. Cell*, **47**, 535–546, doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.009.
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D. M. (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1, *Science*, **320**, 1496–1501, doi: 10.1126/science.1157535.
- Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y., and Okada, M. (2009) The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes, *EMBO J.*, **28**, 477–489, doi: 10.1038/emboj.2008.308.
- Zhang, C.-S., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y.-L., Wu, Y.-Q., Li, T. Y., Liang, Y., Lu, Z., Lian, G., Liu, Q., Guo, H., Yin, Z., Ye, Z., Han, J., Wu, J.-W., Yin, H., Lin, S.-Y., and Lin, S.-C. (2014) The lysosomal v-ATPase-regulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism, *Cell Metab.*, **20**, 526–540, doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.014.

20. Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., and Sabatini, D. M. (2012) Ragulator is a GEF for the Rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1 *Cell*, **150**, 1196-1208, doi: 10.1016/j.cell.2012.07.032.
21. Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D. M. (2011) mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase, *Science*, **334**, 678-683, doi: 10.1126/science.1207056.
22. Shen, K., Huang, R. K., Brignole, E. J., Condon, K. J., Valenstein, M. L., Chantranupong, L., Bomaliyamu, A., Choe, A., Hong, C., Yu, Z., and Sabatini, D. M. (2018) Architecture of the human GATOR1 and GATOR1-Rag GTPases complexes, *Nature*, **556**, 64-69, doi: 10.1038/nature26158.
23. Gu, X., Orozco, J. M., Saxton, R. A., Condon, K. J., Liu, G. Y., Krawczyk, P. A., Scaria, S. M., Harper, J. W., Gygi, S. P., and Sabatini, D. M. (2017) SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway, *Science*, **358**, 813-818, doi: 10.1126/science.aao3265.
24. Chantranupong, L., Wolfson, R. L., Orozco, J. M., Saxton, R. A., Scaria, S. M., Bar-Peled, L., Spooner, E., Isasa, M., Gygi, S. P., and Sabatini, D. M. (2014) The sestrins interact with GATOR2 to negatively regulate the amino acid sensing pathway upstream of mTORC1, *Cell Rep.*, **9**, 1-8, doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.014.
25. Wolfson, R. L., Chantranupong, L., Saxton, R. A., Shen, K., Scaria, S. M., Cantor, J. R., and Sabatini, D. M. (2016) Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway, *Science*, **351**, 43-48, doi: 10.1126/science.aab2674.
26. Kim, H., An, S., Ro, S.-H., Teixeira, F., Park, G. J., Kim, C., Cho, C.-S., Kim, J.-S., Jakob, U., Lee, J. H., and Cho, U.-S. (2015) Janus-faced sestrin2 controls ROS and mTOR signalling through two separate functional domains, *Nat. Commun.*, **6**, 10025, doi: 10.1038/ncomms10025.
27. Chantranupong, L., Scaria, S. M., Saxton, R. A., Gygi, M. P., Shen, K., Wyant, G. A., Wang, T., Harper, J. W., Gygi, S. P., and Sabatini, D. M. (2016) The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 pathway, *Cell*, **165**, 153-164, doi: 10.1016/j.cell.2016.02.035.
28. Gai, Z., Wang, Q., Yang, C., Wang, L., Deng, W., and Wu, G. (2016) Structural mechanism for the arginine sensing and regulation of CASTOR1 in the mTORC1 signaling pathway, *Cell Discov.*, **2**, 16051, doi: 10.1038/celldisc.2016.51.
29. Shen, K., Rogala, K. B., Chou, H.-T., Huang, R. K., Yu, Z., and Sabatini, D. M. (2019) Cryo-EM structure of the human FLCN-FNIP2-Rag-Ragulator complex, *Cell*, **179**, 1319-1329, doi: 10.1016/j.cell.2019.10.036.
30. Meng, J., and Ferguson, S. M. (2018) GATOR1-dependent recruitment of FLCN-FNIP to lysosomes coordinates Rag GTPase heterodimer nucleotide status in response to amino acids, *J. Cell Biol.*, **217**, 2765-2776, doi: 10.1083/jcb.201712177.
31. Baba, M., Hong, S.-B., Sharma, N., Warren, M. B., Nickerson, M. L., Iwamatsu, A., Esposito, D., Gillette, W. K., Hopkins, R. F., Hartley, J. L., Furihata, M., Oishi, S., Zhen, W., Burke, T. R., Linehan, W. M., Schmidt, L. S., and Zbar, B. (2006) Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15552-15557, doi: 10.1073/pnas.0603781103.
32. Starling, G. P., Yip, Y. Y., Sanger, A., Morton, P. E., Eden, E. R., and Dodding, M. P. (2016) Folliculin directs the formation of a Rab34-RILP complex to control the nutrient-dependent dynamic distribution of lysosomes, *EMBO Rep.*, **17**, 823-841, doi: 10.15252/embr.201541382.
33. Lee, M., Kim, J. H., Yoon, I., Lee, C., Sichani, M. F., Kang, J. S., Kang, J., Guo, M., Lee, K. Y., Han, G., Kim, S., and Han, J. M. (2018) Coordination of the leucine-sensing Rag GTPase cycle by leucyl-tRNA synthetase in the mTORC1 signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 5279-5288, doi: 10.1073/pnas.1801287115.
34. Mohan, N., Shen, Y., Dokmanovic, M., Endo, Y., Hirsch, D. S., and Wu, W. J. (2016) VPS34 regulates TSC1/TSC2 heterodimer to mediate RheB and mTORC1/S6K1 activation and cellular transformation, *Oncotarget*, **7**, 52239-52254, doi: 10.18632/oncotarget.10469.
35. Yoon, M.-S., Rosenberger, C. L., Wu, C., Truong, N., Sweedler, J. V., and Chen, J. (2015) Rapid mitogenic regulation of the mTORC1 inhibitor, DEPTOR, by phosphatidic acid, *Mol. Cell*, **58**, 549-556, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.028.
36. Yoon, M.-S., Sun, Y., Arauz, E., Jiang, Y., and Chen, J. (2011) Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect, *J. Biol. Chem.*, **286**, 29568-29574, doi: 10.1074/jbc.M111.262816.
37. Dayam, R. M., Saric, A., Shilliday, R. E., and Botelho, R. J. (2015) The phosphoinositide-gated lysosomal Ca²⁺ channel, TRPML1, is required for phagosome maturation, *Traffic Cph. Den.*, **16**, 1010-1026, doi: 10.1111/tra.12303.
38. Durán, R. V., Oppliger, W., Robitaille, A. M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., and Hall, M. N. (2012) Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling, *Mol. Cell*, **47**, 349-358, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.043.
39. Mony, V. K., Benjamin, S., and O'Rourke, E. J. (2016) A lysosome-centered view of nutrient homeostasis, *Autophagy*, **12**, 619-631, doi: 10.1080/15548627.2016.1147671.
40. Lim, C.-Y., and Zoncu, R. (2016) The lysosome as a command-and-control center for cellular metabolism: lysosomes as orchestrators of cellular metabolism, *J. Cell Biol.*, **214**, 653-664, doi: 10.1083/jcb.201607005.
41. Lamming, D. W., and Bar-Peled, L. (2019) Lysosome: the metabolic signaling hub, *Traffic*, **20**, 27-38, doi: 10.1111/tra.12617.
42. Tyagi, R., Shahani, N., Gorgen, L., Ferretti, M., Pryor, W., Chen, P. Y., Swarnkar, S., Worley, P. F., Karbstein, K., Snyder, S. H., and Subramaniam, S. (2015) Rheb inhibits protein synthesis by activating the PERK-eIF2 α signaling cascade, *Cell Rep.*, **10**, 684-693, doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.014.
43. Martina, J. A., and Puertollano, R. (2013) Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes, *J. Cell Biol.*, **200**, 475-491, doi: 10.1083/jcb.201209135.
44. Goberdhan, D. C. (2010) Intracellular amino acid sensing and mTORC1-regulated growth: new ways to block an old target? *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.*, **11**, 1360-1367.
45. Ögmundsdóttir, M. H., Heublein, S., Kazi, S., Reynolds, B., Visvalingam, S. M., Shaw, M. K., and Goberdhan, D. C. I. (2012) Proton-assisted amino acid transporter PAT1 complexes with Rag GTPases and activates TORC1 on late endosomal and lysosomal membranes, *PLoS One*, **7**, e36616, doi: 10.1371/journal.pone.0036616.
46. Zoncu, R., Sabatini, D. M., and Efeyan, A. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 21-35, doi: 10.1038/nrm3025.
47. Kailash, R., and Aylett, C. H. S. (2018) Signal integration in the (m)TORC1 growth pathway, *Front. Biol.*, **13**, 237-262, doi: 10.1007/s11515-018-1501-7.
48. Lei, H.-T., Ma, J., Sanchez Martinez, S., and Gonen, T. (2018) Crystal structure of arginine-bound lysosomal

- transporter SLC38A9 in the cytosol-open state, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 522–527, doi: 10.1038/s41594-018-0072-2.
49. Cherfils, J. (2017) Encoding allostery in mTOR signaling: the structure of the Rag GTPase/ragulator complex, *Mol. Cell*, **68**, 823–824, doi: 10.1016/j.molcel.2017.11.027.
 50. Mu, Z., Wang, L., Deng, W., Wang, J., and Wu, G. (2017) Structural insight into the Ragulator complex which anchors mTORC1 to the lysosomal membrane, *Cell Discov.*, **3**, 17049, doi: 10.1038/celldisc.2017.49.
 51. Yonehara, R., Nada, S., Nakai, T., Nakai, M., Kitamura, A., Ogawa, A., Nakatsumi, H., Nakayama, K. I., Li, S., Standley, D. M., Yamashita, E., Nakagawa, A., and Okada, M. (2017) Structural basis for the assembly of the Ragulator-Rag GTPase complex, *Nat. Commun.*, **8**, 1625, doi: 10.1038/s41467-017-01762-3.
 52. Zhang, T., Wang, R., Wang, Z., Wang, X., Wang, F., and Ding, J. (2017) Structural basis for Ragulator functioning as a scaffold in membrane-anchoring of Rag GTPases and mTORC1, *Nat. Commun.*, **8**, 1394, doi: 10.1038/s41467-017-01567-4.
 53. Yu, Y., Li, S., Xu, X., Li, Y., Guan, K., Arnold, E., and Ding, J. (2005) Structural basis for the unique biological function of small GTPase RHEB, *J. Biol. Chem.*, **280**, 17093–17100, doi: 10.1074/jbc.M501253200.
 54. Mazhab-Jafari, M. T., Rohou, A., Schmidt, C., Bueler, S. A., Benlekbir, S., Robinson, C. V., and Rubinstein, J. L. (2016) Atomic model for the membrane-embedded VO motor of a eukaryotic v-ATPase, *Nature*, **539**, 118–122, doi: 10.2210/pdb5tj5/pdb.
 55. Zhao, J., Benlekbir, S., and Rubinstein, J. L. (2015) Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic v-ATPase, *Nature*, **521**, 241–245, doi: 10.1038/nature14365.
 56. Aylett, C. H. S., Sauer, E., Imseng, S., Boehringer, D., Hall, M. N., Ban, N., and Maier, T. (2016) Architecture of human mTOR complex 1, *Science*, **351**, 48–52, doi: 10.1126/science.aaa3870.
 57. Yang, H., Wang, J., Liu, M., Chen, X., Huang, M., Tan, D., Dong, M.-Q., Wong, C. C. L., Wang, J., Xu, Y., and Wang, H.-W. (2016) 4.4 Å Resolution Cryo-EM structure of human mTOR complex 1, *Protein Cell*, **7**, 878–887, doi: 10.1007/s13238-016-0346-6.
 58. Basso, A. D., Mirza, A., Liu, G., Long, B. J., Bishop, W. R., and Kirschmeier, P. (2005) The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity, *J. Biol. Chem.*, **280**, 31101–31108, doi: 10.1074/jbc.M503763200.
 59. Rogala, K. B., Gu, X., Kedir, J. F., Abu-Remaileh, M., Bianchi, L. F., Bottino, A. M. S., Dueholm, R., Niehaus, A., Overwijn, D., Fils, A.-C. P., Zhou, S. X., Leary, D., Laqtom, N. N., Brignole, E. J., and Sabatini, D. M. (2019) Structural basis for the docking of mTORC1 on the lysosomal surface, *Science*, **366**, 468–475, doi: 10.1126/science.aay0166.
 60. Peng, W., and Jewell, J. L. (2020) Amino acid sensing: architecture of mTORC1 on the lysosome surface, *Curr. Biol.*, **30**, 89–91, doi: 10.1016/j.cub.2019.11.087.
 61. Fan, S.-J., Snell, C., Turley, H., Li, J.-L., McCormick, R., Perera, S. M. W., Heublein, S., Kazi, S., Azad, A., Wilson, C., Harris, A. L., and Goberdhan, D. C. I. (2016) PAT4 levels control amino-acid sensitivity of rapamycin-resistant mTORC1 from the Golgi and affect clinical outcome in colorectal cancer, *Oncogene*, **35**, 3004–3015, doi: 10.1038/onc.2015.363.
 62. Pedroso, J. A. B., Zampieri, T. T., and Donato, J. (2015) Reviewing the effects of L-leucine supplementation in the regulation of food intake, energy balance, and glucose homeostasis, *Nutrients*, **7**, 3914–3937, doi: 10.3390/nu7053914.
 63. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., and Murphy, L. O. (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy, *Cell*, **136**, 521–534, doi: 10.1016/j.cell.2008.11.044.
 64. Wyant, G. A., Abu-Remaileh, M., Wolfson, R. L., Chen, W. W., Freinkman, E., Danai, L. V., Vander Heiden, M. G., and Sabatini, D. M. (2017) mTORC1 activator SLC38A9 is required to efflux essential amino acids from lysosomes and use protein as a nutrient, *Cell*, **171**, 642–654, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.046.
 65. Kilberg, M. S., Shan, J., and Su, N. (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation, *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**, 436–443, doi: 10.1016/j.tem.2009.05.008.
 66. Lawrence, R. E., Cho, K. F., Rappold, R., Thrun, A., Tofaute, M., Kim, D. J., Moldavski, O., Hurley, J. H., and Zoncu, R. (2018) A nutrient-induced affinity switch controls mTORC1 activation by its Rag GTPase-ragulator lysosomal scaffold, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 1052–1063, doi: 10.1038/s41556-018-0148-6.
 67. Wong, P.-M., Feng, Y., Wang, J., Shi, R., and Jiang, X. (2015) Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A, *Nat. Commun.*, **6**, 8048, doi: 10.1038/ncomms9048.
 68. Shen, K., Choe, A., and Sabatini, D. M. (2017) Intersubunit crosstalk in the Rag GTPase heterodimer enables mTORC1 to respond rapidly to amino acid availability, *Mol. Cell*, **68**, 552–565, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.026.
 69. Thomas, H. E., Zhang, Y., Stefely, J. A., Veiga, S. R., Thomas, G., Kozma, S. C., and Mercer, C. A. (2018) Mitochondrial complex I activity is required for maximal autophagy, *Cell Rep.*, **24**, 2417, doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.101.
 70. Adachi, Y., De Sousa-Coelho, A. L., Harata, I., Aoun, C., Weimer, S., Shi, X., Gonzalez Herrera, K. N., Takahashi, H., Doherty, C., Noguchi, Y., Goodyear, L. J., Haigis, M. C., Gerszten, R. E., and Patti, M.-E. (2018) L-alanine activates hepatic AMP-activated protein kinase and modulates systemic glucose metabolism, *Mol. Metab.*, **17**, 61–70, doi: 10.1016/j.molmet.2018.08.002.
 71. Kimball, S. R., Gordon, B. S., Moyer, J. E., Dennis, M. D., and Jefferson, L. S. (2016) Leucine induced dephosphorylation of sestrin2 promotes mTORC1 activation, *Cell. Signal.*, **28**, 896–906, doi: 10.1016/j.cellsig.2016.03.008.
 72. Parmigiani, A., Nourbakhsh, A., Ding, B., Wang, W., Kim, Y. C., Akopiants, K., Guan, K.-L., Karin, M., and Budanov, A. V. (2014) Sestrins inhibit mTORC1 kinase activation through the GATOR complex, *Cell Rep.*, **9**, 1281–1291, doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.019.
 73. Wauson, E. M., Zaganjor, E., Lee, A.-Y., Guerra, M. L., Ghosh, A. B., Bookout, A. L., Chambers, C. P., Jivan, A., McGlynn, K., Hutchison, M. R., Debernardinis, R. J., and Cobb, M. H. (2012) The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy, *Mol. Cell*, **47**, 851–862, doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.001.
 74. Pezze, P. D., Ruf, S., Sonntag, A. G., Langelaar-Makkinje, M., Hall, P., Heberle, A. M., Navas, P. R., van Eunen, K., Tölle, R. C., Schwarz, J. J., Wiese, H., Warscheid, B., Deitersen, J., Stork, B., Fäßler, E., Schauble, S., Hahn, U., Horvathovich, P., Shanley, D. P., and Thedieck, K. (2016) A systems study reveals concurrent activation of AMPK and mTOR by amino acids, *Nat. Commun.*, **7**, doi: 10.1038/ncomms13254.
 75. Krall, A. S., Xu, S., Graeber, T. G., Braas, D., and Christofk, H. R. (2016) Asparagine promotes cancer cell

- proliferation through use as an amino acid exchange factor, *Nat. Commun.*, **7**, 11457, doi: 10.1038/ncomms11457.
76. Dyachok, J., Earnest, S., Iturraran, E. N., Cobb, M. H., and Ross, E. M. (2016) Amino acids regulate mTORC1 by an obligate two-step mechanism, *J. Biol. Chem.*, **291**, 22414–22426, doi: 10.1074/jbc.M116.732511.
 77. Ruderman, N. B., Xu, X. J., Nelson, L., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Lan, F., and Ido, Y. (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **298**, 751–760, doi: 10.1152/ajpendo.00745.2009.
 78. Kim, J. H., Lee, C., Lee, M., Wang, H., Kim, K., Park, S. J., Yoon, I., Jang, J., Zhao, H., Kim, H. K., Kwon, N. H., Jeong, S. J., Yoo, H. C., Kim, J. H., Yang, J. S., Lee, M. Y., Lee, C. W., Yun, J., Oh, S. J., Kang, J. S., Martinis, S. A., Hwang, K. Y., Guo, M., Han, G., Han, J. M., and Kim, S. (2017) Control of leucine-dependent mTORC1 pathway through chemical intervention of leucyl-tRNA synthetase and Rag D interaction, *Nat. Commun.*, **8**, 732, doi: 10.1038/s41467-017-00785-0.
 79. Yoon, M.-S., Son, K., Arauz, E., Han, J. M., Kim, S., and Chen, J. (2016) Leucyl-tRNA synthetase activates Vps34 in amino acid-sensing mTORC1 signaling, *Cell Rep.*, **16**, 1510–1517, doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.008.
 80. Wolfson, R. L., Chantranupong, L., Wyant, G. A., Gu, X., Orozco, J. M., Shen, K., Condon, K. J., Petri, S., Kedir, J., Scaria, S. M., Abu-Remaileh, M., Frankel, W. N., and Sabatini, D. M. (2017) KICSTOR recruits GATOR1 to the lysosome and is necessary for nutrients to regulate mTORC1, *Nature*, **543**, 438–442, doi: 10.1038/nature21423.
 81. Tomita, T., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2011) Structural basis for leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **286**, 37406–37413, doi: 10.1074/jbc.M111.260265.
 82. Durán, R. V., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Frezza, C., Heiserich, L., Tardito, S., Bussolati, O., Rocha, S., Hall, M. N., and Gottlieb, E. (2013) HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids, *Oncogene*, **32**, 4549–4556, doi: 10.1038/onc.2012.465.
 83. Milkereit, R., Persaud, A., Vanoaica, L., Guetg, A., Verrey, F., and Rotin, D. (2015) LAPTM4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation, *Nat. Commun.*, **6**, 7250, doi: 10.1038/ncomms8250.
 84. Shang, P., Valapala, M., Grebe, R., Hose, S., Ghosh, S., Bhutto, I. A., Handa, J. T., Luty, G. A., Lu, L., Wan, J., Qian, J., Sergeev, Y., Puertollano, R., Zigler, J. S., Xu, G.-T., and Sinha, D. (2017) The amino acid transporter SLC36A4 regulates the amino acid pool in retinal pigmented epithelial cells and mediates the mechanistic target of rapamycin, complex 1 signaling, *Aging Cell*, **16**, 349–359, doi: 10.1111/acer.12561.
 85. Andrzejewska, Z., Nevo, N., Thomas, L., Chhuon, C., Bailleux, A., Chauvet, V., Courtoy, P. J., Chol, M., Guerrero, I. C., and Antignac, C. (2016) Cystinosin is a component of the vacuolar H⁺-ATPase-Ragulator–Rag complex controlling mammalian target of rapamycin complex 1 signaling, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **27**, 1678–1688, doi: 10.1681/ASN.2014090937.
 86. Shen, K., and Sabatini, D. M. (2018) Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9545–9550, doi: 10.1073/pnas.1811727115.
 87. Lee, S. W., Cho, B. H., Park, S. G., and Kim, S. (2004) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation, *J. Cell Sci.*, **117**, 3725–3734, doi: 10.1242/jcs.01342.
 88. Fawal, M.-A., Brandt, M., and Djouder, N. (2015) MCORS1 binds and couples Rheb to amino acid-dependent mTORC1 activation, *Dev. Cell*, **33**, 67–81, doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.010.
 89. Carroll, B., Maetzel, D., Maddocks, O. D., Otten, G., Ratcliff, M., Smith, G. R., Dunlop, E. A., Passos, J. F., Davies, O. R., Jaenisch, R., Tee, A. R., Sarkar, S., and Korolchuk, V. I. (2016) Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity, *eLife*, **5**, e11058, doi: 10.7554/eLife.11058.
 90. Jewell, J. L., Kim, Y. C., Russell, R. C., Yu, F.-X., Park, H. W., Plouffe, S. W., Tagliabracci, V. S., and Guan, K.-L. (2015) Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine, *Science*, **347**, 194–198, doi: 10.1126/science.1259472.
 91. Laxman, S., Sutter, B. M., and Tu, B. P. (2014) Methionine is a signal of amino acid sufficiency that inhibits autophagy through the methylation of PP2A, *Autophagy*, **10**, 386–387, doi: 10.4161/auto.27485.
 92. Sutter, B. M., Wu, X., Laxman, S., and Tu, B. P. (2013) Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A, *Cell*, **154**, 403–415, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.041.
 93. Chen, L., Wang, K., Long, A., Jia, L., Zhang, Y., Deng, H., Li, Y., Han, J., and Wang, Y. (2017) Fasting-induced hormonal regulation of lysosomal function, *Cell Res.*, **27**, 748–763, doi: 10.1038/cr.2017.45.
 94. Yuan, W., Guo, S., Gao, J., Zhong, M., Yan, G., Wu, W., Chao, Y., and Jiang, Y. (2017) General control nonderepressible 2 (GCN2) kinase inhibits target of rapamycin complex 1 in response to amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 2660–2669, doi: 10.1074/jbc.M116.772194.
 95. Averous, J., Lambert-Langlais, S., Mesclon, F., Carraro, V., Parry, L., Jousse, C., Bruhat, A., Maurin, A.-C., Pierre, P., Proud, C. G., and Fournoux, P. (2016) GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism, *Sci. Rep.*, **6**, 27698, doi: 10.1038/srep27698.
 96. Floyd, J. C., Fajans, S. S., Pek, S., Thiffault, C. A., Knopf, R. F., and Conn, J. W. (1970) Synergistic effect of certain amino acid pairs upon insulin secretion in man, *Diabetes*, **19**, 102–108, doi: 10.2337/diab.19.2.102.
 97. Choi, Y. H., Fletcher, P. J., and Anderson, G. H. (2001) Extracellular amino acid profiles in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus are influenced by diet composition, *Brain Res.*, **892**, 320–328, doi: 10.1016/s0006-8993(00)03267-4.
 98. Su, Y., Lam, T. K. T., He, W., Poca, A., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., and Gutiérrez-Juárez, R. (2012) Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production, *Diabetes*, **61**, 85–93, doi: 10.2337/db11-0857.
 99. Xiao, Y., Deng, Y., Yuan, F., Xia, T., Liu, H., Li, Z., Liu, Z., Ying, H., Liu, Y., Zhai, Q., Chen, S., and Guo, F. (2017) ATF4/ATG5 signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons regulates fat mass via affecting energy expenditure, *Diabetes*, **66**, 1146–1158, doi: 10.2337/db16-1546.
 100. Delgoffe, G. M., Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Heikamp, E., Meyers, D. J., Horton, M. R., Xiao, B., Worley, P. F., and Powell, J. D. (2011) The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2, *Nat. Immunol.*, **12**, 295–303, doi: 10.1038/ni.2005.
 101. Bao, W., Wang, Y., Fu, Y., Jia, X., Li, J., Vangan, N., Bao, L., Hao, H., and Wang, Z. (2015) mTORC1 regulates flagellin-induced inflammatory response in macrophages, *PLoS One*, **10**, e0125910, doi: 10.1371/journal.pone.0125910.
 102. Decker, B., and Pumiglia, K. (2018) mTORC1 activity is necessary and sufficient for phosphorylation of eNOS S1177, *Physiol. Rep.*, **6**, e13733, doi: 10.14814/phy2.13733.

103. Nesterov, S. V., Yaguzhinsky, L. S., Podoprighora, G. I., and Nartsissov, Y. R. (2018) Autocatalytic cycle in the pathogenesis of diabetes mellitus: biochemical and pathophysiological aspects of metabolic therapy with natural amino acids on the example of glycine, *Diabetes Mellit.*, **21**, 283-292, doi: 10.14341/DM9529.
104. Podoprighora, G. I., and Nartsissov, Y. R. (2009) Effect of glycine on the microcirculation in rat mesenteric vessels, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **147**, 308-311, doi: 10.1007/s10517-009-0498-y.
105. Podoprighora, G. I., Nartsissov, Y. R., and Aleksandrov, P. N. (2005) Effect of glycine on microcirculation in pial vessels of rat brain, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **139**, 675-677, doi: 10.1007/s10517-005-0375-2.
106. Podoprighora, G. I., Blagosklonov, O., Angoué, O., Boulahdour, H., and Nartsissov, Y. R. (2012) Assessment of microcirculatory effects of glycine by intravital microscopy in rats, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2012**, 2651-2654, doi: 10.1109/EMBC.2012.6346509.

AMINO ACIDS AS METABOLIC REGULATORS

Review

S. V. Nesterov^{1,2}, L. S. Yaguzhinsky^{1,3*}, G. I. Podoprighora¹, and Ya. R. Nartsissov¹

¹ *Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, 115404 Moscow, Russia; E-mail: yag@genebee.msu.ru*

² *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

³ *Belozersky Research Institute for Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received October 3, 2019

Revised February 10, 2020

Accepted February 11, 2020

In this analytical review the regulation and synchronization principles of metabolic processes in mammalian cells were studied. It was used a model of cell metabolism as a two-componential system, which includes a controlling signaling system (that regulates the main enzymatic systems), and an executive metabolic system (that directly performs biosynthesis). This consideration allowed us to distinguish two transitional metabolic states (transition from catabolism to anabolism and vice versa), in which the main changes in the signaling system occur. The signaling system of natural amino acids (AAs) was selected for review as the most convenient fragment of the cell metabolism, since AAs are involved in both signaling and executive metabolic subsystems. A graphical method for representation of signaling events was developed in the work. It made possible to demonstrate the processes sequence occurring in both metabolic subsystems during the passage of a complete metabolic cycle by a non-dividing cell. An important feature of the AA signaling system was revealed: their signal properties are determined not only by molecular structure, but also by their location in the cell. Four main signaling groups of AAs were determined: localized in lysosomes, mitochondria, cytosol, and extracellular space near the plasma membrane. These AA groups are similar in composition, but have different receptors. The scheme of metabolism regulation by AAs was constructed in this work and can serve as basis for the development of a more complete spatio-temporal scheme of metabolic regulation, which includes a wide variety of other intracellular signaling cascades.

Keywords: amino acids, intracellular signaling, mTORC1, AMPK, lysosome, catabolism, anabolism

УДК 577.151.36

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ СУБЪЕДИНИЦА РКА КАК ПРОТОТИП СЕМЕЙСТВА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНКИНАЗ

Обзор

© 2020 Б.А. Рейхардт*, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины, 197376 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: reichardt@mail.ru

Поступила в редакцию 21.10.2019

После доработки 25.02.2020

Принята к публикации 26.02.2020

Каталитическая субъединица РКА (РКАс) представляет собой практически изолированный киназный домен, консервативный у всех эукариотических протеинкиназ. РКАс состоит из двух долей, образующих каталитическую щель, в которой располагаются: АТР-связывающий участок, пептид-связывающий участок и каталитический сайт. В процессе фолдинга вторичные структуры РКАс укладываются так, что неполярные участки собираются в глобулярное ядро, а подвижные петли и хвосты экспонируются наружу, образуя регуляторные элементы. Синтезированная *de novo* РКАс подвергается процессингу путем фосфорилирования Т-петли. При этом формируется полноценный активный центр, способный высокоаффинно связывать косубстраты. Молекула АТР «склеивает» две доли вместе, а связывание пептидного субстрата завершает сборку активного центра. В результате «каталитическая триада» (γ -фосфат АТР, гидроксил Ser/Thr белка-субстрата и карбоксил Asp166) занимает положение, оптимальное для эффективного катализа. Динамическая реорганизация полярных и гидрофобных взаимодействий в ходе каталитического цикла обеспечивает переход РКАс из открытой конформации в закрытую и обратно. Изучение структурных основ работы ePK необходимо для успешного создания модуляторов ePK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: каталитическая субъединица РКА, АТР-связывающий сайт РКА, пептид-связывающий сайт РКА, Thr197 РКА, гидрофобные спины.

DOI: 10.31857/S0320972520040028

сАМР-Зависимая протеинкиназа (сАРК), получившая известность как РКА (протеинкиназа А), была открыта в 1968 г. [1]. Уже первые кристаллические структуры РКАс [2, 3], полученные к 1991–1993 гг., легли в основу классификации консервативных доменов (ePK, eukaryotic protein kinases) [4]. Будучи наиболее просто организованной и хорошо изученной, РКАс прочно вошла в научную литературу, как прототип обширного и разнообразного семейства ePK [5–11].

СЕМЕЙСТВО ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНКИНАЗ

С момента открытия фосфорилирования, как важнейшего механизма регуляции функций белков, стало очевидно, что протеинкиназы (РК) играют ключевую роль во всех аспектах клеточной жизни [12–16]. РК относятся к классу фосфотрансфераз [17], катализирующих перенос фосфосодержащей группы на различ-

ные субстраты. Выделяют серин/треониновые РК, осуществляющие перенос фосфата на аминокислотный осадок (а.о.) серина или треонина (протеин-Ser/Thr-киназы); РК, переносящие фосфат на остаток тирозина (протеин-Туг-киназы); РК двойной специфичности (Ser/Thr- и Туг-киназы); а также аргинин-, гистидин-киназы прокариот и другие [18].

Ser/Thr-киназы, вместе с Туг-киназами (ТК), составляют наиболее важную группу ePK [19]. У человека относительные доли фосфорилирования белков по Ser, Thr, и Туг составляют ~ 86, 12 и 2% [20]. Несмотря на небольшой вклад в общее фосфорилирование, ТК занимают особое место, благодаря высокому онкогенному потенциалу. Многие цитоплазматические онкогены обладают Туг-киназной активностью, а мембранные рецепторы факторов роста представляют собой рецепторные ТК [21].

В протеоме человека выявлено 518 РК, из которых 478 содержат характерный для всех ePK консервативный каталитический домен; а 40 — представляют собой атипичные РК, обладающие киназной активностью, но не проявляющие структурного сходства с ePK. Эволюцион-

* Адресат для корреспонденции.

ное дерево ePK делится на восемь основных групп. К семейству AGC относятся PKA, PKG и PKC; в семейство CaMK входят Ca/кальмодулин-зависимые PK; семейство CK1 представляет казеинкиназа 1; семейство CMGC образуют циклин-зависимые PK (CDK), митоген-активируемые PK (MAPK), киназа гликогенсинтазы (GSK) и CDK-подобные PK; семейство STE составляют PK верхних эшелонов каскада MAPK, аналоги дрожжевой PK STE; семейства TK и TKL включают Туг-киназы и ТК-подобные киназы; и наконец, членами семейства RGC являются рецепторные гуанилатциклазы, обладающие ТК-доменом [19].

МОДУЛЬНАЯ СТРУКТУРА ePK

Являясь ключевыми ферментами внутриклеточной сигнализации, PK должны выполнять свои функции в строго определенное время и строго определенном месте. Эти принципы воплощает модульная структура ePK (рис. 1). Наряду с каталитическим доменом, многие

Ser/Thr-киназы и Туг-киназы имеют регуляторные (R) домены [22–26]. Обычно R-домен блокирует киназную активность (PKC, PKG, CaMKII), выступая в роли псевдосубстрата. Активацию таких PK осуществляют низкомолекулярные аллостерические эффекторы (Ca^{2+} , cAMP/cGMP, фосфолипиды), которые, связываясь с R-доменом, устраняют автоингибирующий эффект. PK семейства CaMK, не способные самостоятельно связывать Ca^{2+} , используют Ca-связывающий белок кальмодулин в качестве сенсора Ca^{2+} -сигнала [27]. К регуляторным элементам относятся также сайты фосфорилирования/автофосфорилирования, присутствующие в структуре многих ePK.

Субклеточная локализация PK регулируется путем ассоциации с мембранными липидами, скаффолдами, шаперонами и адаптерными белками. Для этого в составе ePK имеются домены (PH, C1, C2, PX, FERM), связывающие определенные фракции мембранных фосфолипидов; домены (SH3, SH2, 14-3-3), распознающие аминокислотные мотивы (Pro-xx-Pro) или ковалентно модифицированные аминокислоты

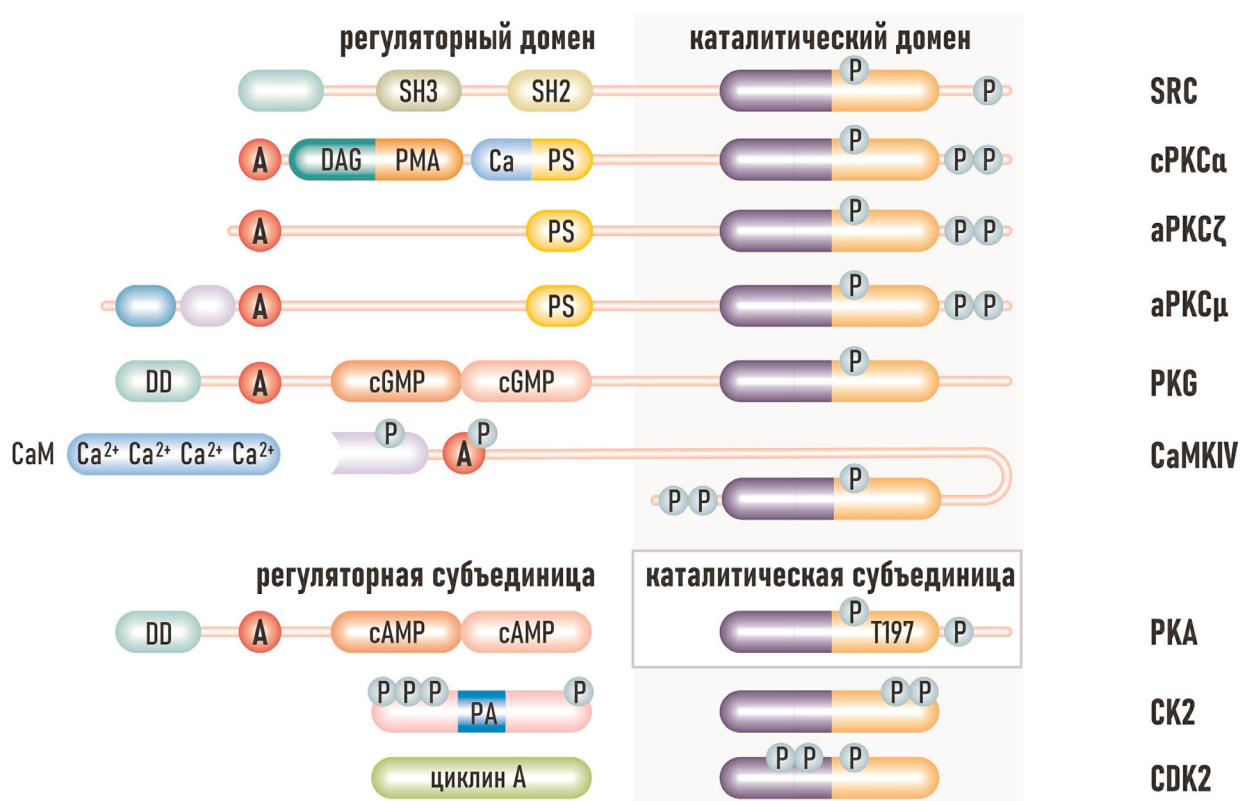


Рис. 1. Модульная структура ePK. А – автоингибирующий домен, Р – сайты фосфорилирования, DD – домен димеризации, NLS – сигнал ядерной локализации. Сайты, связывающие эффекторные молекулы: DAG – диацилглицерол, PMA – фторболовый эфир, PS – фосфатидилсерин, Ca – Ca^{2+} , CaM – кальмодулин, PA – полиамины. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

(pTyr/pSer); а также домены, способные к димеризации (DD-DD, PZD-PZD, SAM-SAM) с аналогичными доменами других белков [28]. В ряде случаев функции R-доменов выполняют самостоятельные белки — регуляторные субъединицы. Так, холоферменты CDK1 [29] и CK2 [30] представляют собой гетерокомплексы RC и R₂C₂, где R — регуляторные, а C — каталитические субъединицы.

Холофермент PKA (R₂C₂) состоит из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц [31]. Связывание cAMP с PKA_γ в составе холофермента стимулирует высвобождение двух активных PKA_α-мономеров и последующее фосфорилирование белков-мишеней [32]. Таким образом, PKA_α представляет собой практически изолированный киназный домен ePK, лишенный дополнительных модулей (таких как аутоингибирующий домен, сайты связывания аллостерических эффекторов). В отличие от чрезвычайно разнообразных R-доменов, каталитический домен ePK обладает высокой степенью гомологии и включает 12 консервативных субдоменов, характерных для всех членов семейства. Три важнейшие функции [4]: 1) связывание и ориентация АТР; 2) связывание и ориентация белка-субстрата; и 3) перенос γ-фосфата АТР на Ser/Thr или Tyr белка-субстрата — нашли отражение в структуре PKA_α.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ СУБЪЕДИНИЦА PKA. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

PKA_α состоит из двух долей — N-концевой (малой) и C-концевой (большой), соединяющихся между собой подвижным линкерным участком. Две доли формируют каталитическую щель, в которой размещаются молекула АТР в комплексе с двумя дивалентными катионами (Mg или Mn) и фосфо-акцепторный участок пептидного субстрата.

За связывание АТР преимущественно отвечает N-доля, тогда как C-доля содержит участки для связывания пептида, катализа, и регуляции [3, 6, 33]. Обе доли образуют несколько фармакофорных площадок для связывания различных частей аденозинтрифосфата: «фосфатный якорь», «рибозный якорь», «гидрофобную щель» и аденин-связывающий карман. На поверхности C-доли располагаются: 1) каталитическая петля, участвующая в процессе катализа; 2) Mg-связывающая петля, координирующая положение комплекса Mg₂/АТР; 3) активирующая петля, которая содержит консервативный Thr197, необходимый для активации PKA_α путем фосфорилирования; и 4) P+1-петля и ее окружение,

образующие участок связывания пептида. Три последние петли образуют сегмент активации, выполняющий каталитические и регуляторные функции [7, 34].

Как и многие ePK, PKA_α синтезируется *de novo* в неактивной конформации и требует фосфорилирования для активации [35]. В результате фосфорилирования формируется полноценный активный центр (способный высокоаффинно связывать АТР и пептидный субстрат) и PKA_α переходит в активную конформацию [36–38]. В отсутствие АТР, благодаря гибкому линкерному региону N- и C-доли могут перемещаться относительно друг друга. Такая конформация называется открытой. Молекула АТР, связываясь одновременно с обеими долями, «склеивает» их вместе и переводит фермент в закрытую конформацию. По завершении каталитического цикла PKA_α освобождается от продуктов реакции и снова переходит в открытую конформацию [33, 39, 40].

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ PKA

N-доля. N-доля PKA_α (40–119 а.о.) представлена пятью антипараллельными β-структурами (1–5) и небольшим α-спиральным доменом (A-C) (рис. 2). Спиральный домен включает две переменные α-спирали (αA и αB) и длинную αC-спираль, обязательную для структуры любой ePK [3]. N-доля PKA_α млекопитающих начинается с сайта миристилирования (Gly1), N-концевая аминокислотная группа которого способна ковалентно связывать остаток жирной (миристиновой) кислоты. У немиристилированных форм PKA_α подвижный N-хвост (1–10 а.о.) располагается произвольно [36]. Миристилирование обычно повышает сродство белков к мембранам, однако у свободных PKA_α углеводородная цепь миристиновой кислоты укладывается в гидрофобный карман на поверхности C-доли. Присоединение R-субъединиц освобождает жирнокислотный хвост, и холофермент PKA прекрасно связывается с липидными везикулами [41].

Следующие 11–31 а.о. N-доли образуют амфипатическую αA-спираль. N-конец αA-спирали прочно фиксируется на поверхности большой доли благодаря гидрофобным силам притяжения, а C-конец располагается между долями, ограничивая их подвижность, напоминая сустава. Гидрофобный «сустав» образуют боковые цепи ароматических а.о. Phe26 и Trp30 αA-спирали, которые проникают в обширную гидрофобную щель между долями (Ile94, Ala97, Val98,

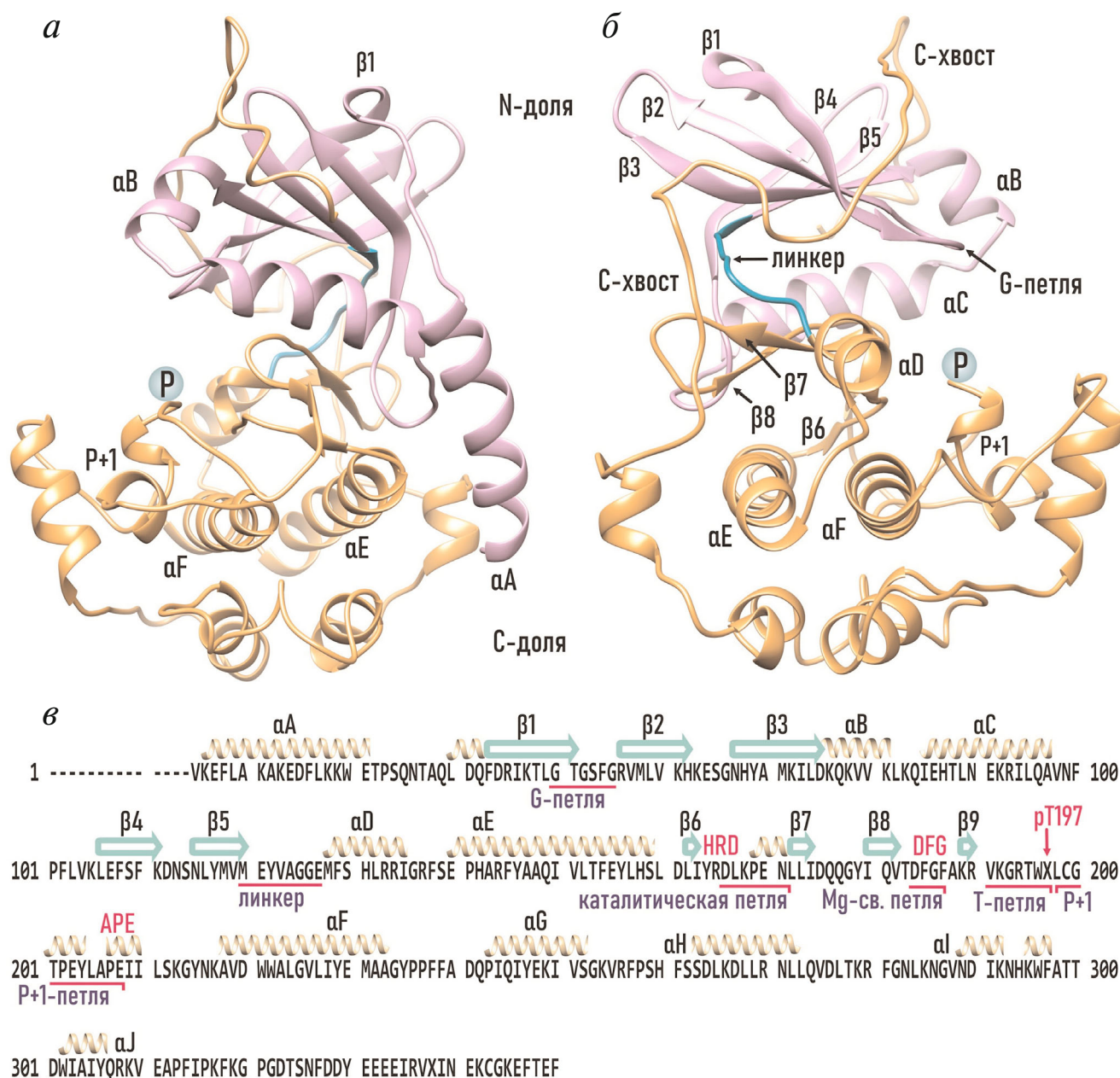


Рис. 2. Структура РКAc мыши по Zheng et al. (1993). *а* – 15–350 а.о.; *б* – 40–350 а.о.; *в* – первичная аминокислотная последовательность. PDB:1ATP.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Tyr156, Leu160, Leu162). Положение Phe26 и Trp30 фиксируют с двух сторон полярные Arg93 αC -спирали и Arg190 $\beta 9$ -структуры. В этом участке С-концы αC -спирали и αA -спирали тесно контактируют и стабилизируют друг друга путем взаимодействий Lys92–Ser34, Arg93–Trp30, Gln96–Lys29, и Gln96–Ser34 [42]. Важнейшими консервативными мотивами *N*-доли являются: G-петля, $\beta 3$ -структура, и αC -спираль, входящие в состав I, II, и III-го субдомена

нов по «анатомической» классификации Хэнкса [4]. Первые два субдомена образуют фосфатный якорь, удерживающий фосфаты АТР, в положении оптимальном для катализа.

G-петля (Glycine-rich loop, G-loop), соединяющая $\beta 1$ - и $\beta 2$ -структуры, получила свое название по глициновому кластеру (Gly50, Gly52, Gly55), консервативному у всех ePK. Обычно к G-петле относят короткие фрагменты $\beta 1$ и $\beta 2$, на которые она опирается. G-петля стабилизи-

руется несколькими внутримолекулярными связями между антипараллельными β -структурами и образует «козырек» над входом в каталитическую щель. В закрытой конформации G-петля покрывает молекулу АТР, изолируя ее от растворителя. При проникновении молекулы АТР в каталитическую щель амиды основной цепи G-петли захватывают фосфаты АТР и координируют их положение внутри активного центра [43]. Ser53 образует водородную связь с ключевым γ -фосфатом, а Phe54 и Gly55 фиксируют β -фосфат. По данным мутационного анализа [44], из трех глицинов наиболее важную роль в связывании АТР играет Gly52, регулирующий положение Ser53 на вершине G-петли [45]. G-петля заканчивается на Val57 β 2-структуры, который вместе с Ala70 образует верхнюю часть гидрофобной щели, вмещающей в себя адениновый гетероцикл АТР.

Вторую часть фосфатного якоря составляет последовательность AxK, относящаяся к β 3-структуре (субдомен II). Находящийся внутри каталитической щели Lys72 этого мотива образует связи с двумя (α и β) фосфатами АТР. В свою очередь, положение Lys72 стабилизирует Glu91, расположенный в начале α C-спирали, с которым Lys72 образует ионную пару [46].

Возможность взаимодействия Lys72–Glu91 критически зависит от конформации подвижной α C-спирали (субдомен III). Располагаясь между двумя долями, своим N-концом α C-спираль тесно контактирует с сегментом активации C-доли, и ее статус зависит от таких факторов, как состояние сайта фосфорилирования, связывание АТР и сборка гидрофобного R-спина [37, 47–49]. В закрытой конформации положение обеих долей фиксирует «застежка», которую образуют His87 α C-спирали и pThr197 петли активации [50].

Важную роль в связывании АТР играют расположенный в глубине каталитической щели линкерный регион (120–127 а.о.), вместе с α D-спиралью, входящий в состав субдомена V. У PKA этот фрагмент содержит один а.о. (Glu127), образующий рибозный якорь, и два а.о. (Glu121 и Val123), отвечающие за распознавание фармакофорных атомов N аденинового гетероцикла АТР.

С-доля. С-доля (128–300 а.о.) включает семь α -спиралей (D–I) и четыре коротких β -структуры (6–9), соединенные между собой петлями. Спиральные домены образуют глобулярное ядро, а экспонированные наружу петли участвуют в связывании косубстратов и регуляции каталитической активности [3] (рис. 2). С-доля начинается с короткой α D-спирали, за которой следует длинная гидрофобная α E-спираль (субдомен VIA). Важнейшим участком С-доли является продолжительный фрагмент, состоящий из β -структур, соединяющихся между собой подвижными петлями (рис. 3). Первой в этом фрагменте располагается каталитическая петля (166–171 а.о.), занимающая место между β 6- и β 7-структурами (субдомен VIB). Консервативный HRD-мотив (His–Arg–Asp) этой петли содержит ключевую пару: Arg165–Asp166, в которой аргинин запускает сборку активного центра в ответ на фосфорилирование петли активации [36], а аспарат непосредственно участвует в процессе катализа. «Каталитический» Asp166 выполняет две функции: выступает в роли протонной ловушки и координирует гидроксильную группу Ser/Thr белка-субстрата относительно γ -фосфата АТР [51–54], положение которого контролирует еще один консервативный остаток (Lys168) каталитической петли. Каталитическая петля содержит также Asp171, хела-

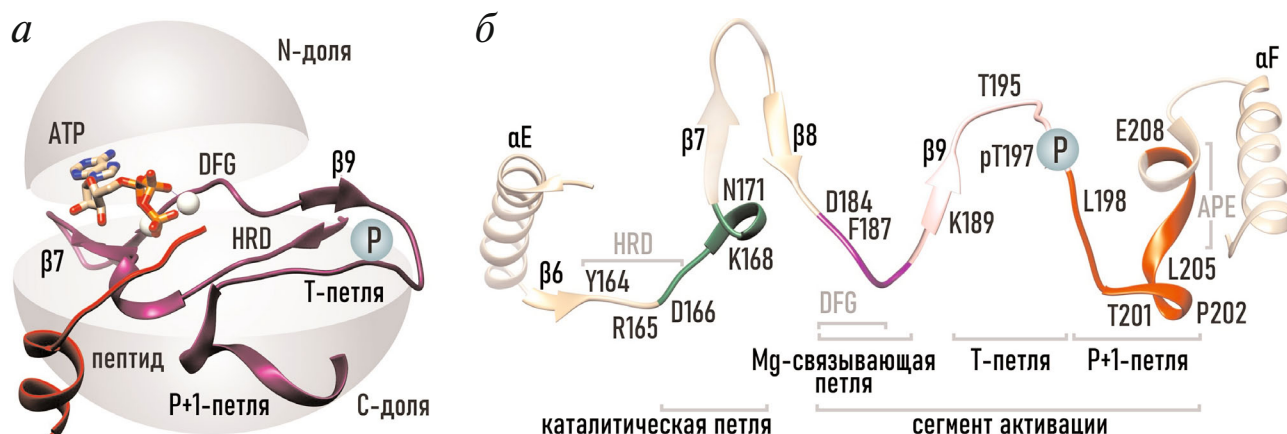


Рис. 3. Каталитическая петля и сегмент активации. *а* — Положение в структуре активной PKAc; *б* — схема. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тирующий Mg-1. За каталитической петлей следует сегмент активации (рис. 3), с одной стороны, опирающийся на $\beta 7/\beta 8$ -структуры, а с другой — на APE-мотив αF -спирали глобулярного ядра. Сегмент активации включает Mg-связывающую петлю, $\beta 9$, активирующую петлю, и P+1-петлю.

Короткая Mg-связывающая петля/Mg-позиционирующая петля (Asp184-Phe-Gly-Phe187) располагается между 8-й и 9-й β -структурами и относится к субдомену VII (176–193 а.о.). Эта петля играет ключевую роль в позиционировании ионов металлов, ассоциированных с АТР. Окружение АТР составляют два иона магния (Mg-1 и Mg-2), необходимые для нейтрализации высокого отрицательного заряда фосфатов и координации трифосфатной группы внутри активного центра. В активной конформации РКAc Asp184 консервативного DFG-мотива (Asp-Phe-Gly) Mg-связывающей петли контролирует положение Mg-1 и Mg-2. Положение Mg-1 дополнительно стабилизирует Asn171 каталитической петли.

Между VII и VIII субдоменами Хэнкса располагается варибельная активирующая петля (188–197 а.о.), так же известная как Т-петля, поскольку содержит консервативные остатки Ser/Thr или Tyr, которые могут быть модифицированы путем фосфорилирования. Иногда в литературе встречается название А-петля (activation-loop). У РКAc сайтом фосфорилирования является Thr197. Фосфорилирование Т-петли представляет собой широко распространенный механизм активации ePK [35, 36, 55]. У некоторых ePK (CDK2, InRK) в нефосфорилированной форме Т-петля препятствует связыванию АТР и пептидного субстрата, и наоборот, фосфорилирование Т-петли стабилизирует РК в активной конформации [56–58].

Последней в сегменте активации располагается P+1-петля (198–208 а.о.). В случае РКAc эта петля образует гидрофобное ложе для неполярного P+1-остатка, характерного для субстратов РК семейства AGC, и ориентирует фосфоакцепторный Р-сайт относительно активного центра. P+1-петля и ее окружение формируют пептид-связывающий участок на поверхности С-доли, поэтому в литературе иногда встречается название пептид-позиционирующая петля [37].

Консервативный мотив APE (Ala206-Pro-Glu208), расположенный в конце P+1-петли, обеспечивает интеграцию между структурами С-доли [46]. Glu208 формирует солевой мост с Arg280 αN - αI -петли, стабилизирующий положение сегмента активации относительно С-концевых αG -, αN - и αI -спиралей; а Ala206 и Pro207 APE-мотива образуют гидрофобный до-

кинг-сайт для Trp222 αF -спирали, следующей за VIII-субдоменом (194–213 а.о.).

Субдомен IX представлен большой неполярной αF -спиралью (218–233 а.о.), выполняющей опорные функции при сборке гидрофобных спинов, составляющих внутреннюю архитектуру РКAc [47, 49, 59]. Субдомен X содержит короткую αG -спираль, а субдомен XI образует подвижный С-хвост большой доли. Некоторые фрагменты С-хвоста, расположенные в непосредственной близости к каталитической щели, участвуют в механизмах связывания косубстратов. Так, остатки 315–327 С-хвоста (рис. 2, б) регулируют доступ к аденин-связывающему карману; а кислый кластер (328–334 а.о.) помогает притягивать положительно заряженные пептиды к активному центру [33, 37, 58].

АТР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК

Поскольку большинство РК используют молекулу АТР в качестве донора фосфата, АТР-связывающий участок (рис. 4) отличается наибольшей консервативностью среди ePK. Молекула АТР, глубоко проникая в каталитическую щель, образует множественные контакты с обеими долями. В составе АТР-связывающего участка выделяют несколько фармакофорных площадок для связывания различных частей молекулы АТР [33, 37].

Фосфатный якорь. Основной функцией этого участка является правильная ориентация γ -фосфата относительно каталитического сайта. В тройном комплексе отрицательно заряженные фосфаты АТР образуют связи с амидами пептидного скелета G-петли и аминокислотными боковыми цепями Lys72 и Lys168. Как видно из рис. 4, положение γ - и β -фосфатов стабилизирует пептидная цепь Ser53-Phe54-Gly55, α - и β -фосфаты связывает Lys72 $\beta 3$ -структуры, а Lys168 каталитической петли образует связь с γ -фосфатом. В свою очередь, позицию Lys72 поддерживает Glu91 αC -спирали, конформация которой зависит от взаимодействия pThr197-His87; а координаты Lys168 определяет цепочка связей pThr197-Arg165-Asp166-Thr201-Lys168. Таким образом, ключевой γ -фосфат АТР занимает оптимальное для катализа положение благодаря взаимодействиям с Ser53 и Lys168 и координационным связям с двумя ионами Mg.

Ионы металлов. В состав комплекса с АТР входят два Mg^{2+} , определяющие конформацию трифосфатной группы. Один из ионов Mg (Mg-1) координирует положение α - и γ -фосфатов АТР, а второй (Mg-2) — β - и γ -фосфатов. Положение ионов Mg контролирует аминокислотное

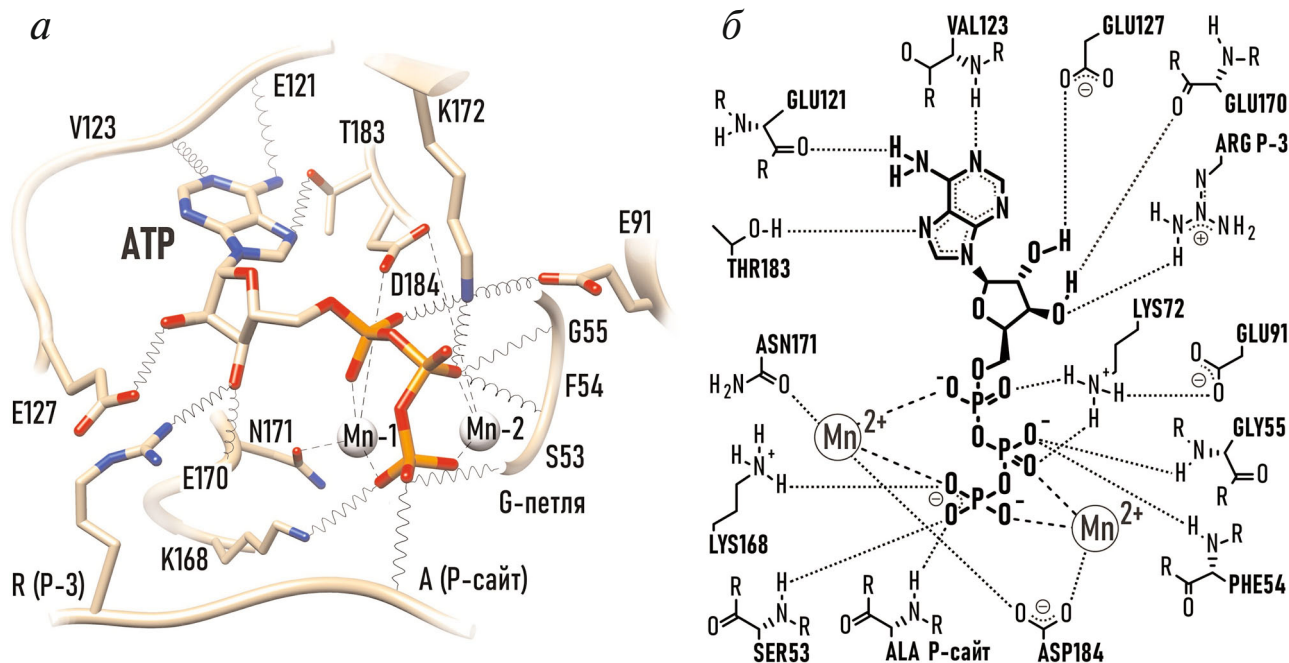


Рис. 4. *a* — АТФ-связывающий участок в тройном комплексе РКAc/Mn-АТФ/PKI₅₋₂₄; *б* — схема. PKI₅₋₂₄ (protein kinase inhibitor) пептид, содержащий субстратоподобную последовательность (RRNAI), где фосфоакцепторный Ser замещен на Ala. PDB:1ATP.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

окружение каталитического сайта. Asn171 каталитической петли образует связь с Mg-1, а Asp184 Mg-связывающей петли образует связи с обоими Mg²⁺ (Mg-1 и Mg-2).

Рибозный якорь образуют два Glu (Glu127 линкерного региона и Glu170 каталитической петли), связывающие 1'ОН- и 2'ОН-группы рибозы. При присоединении белка-субстрата формируется третья водородная связь между Arg в положении P-3 и 2'ОН-группой рибозы.

Гидрофобную щель, в которой размещается плоский скелет аденинового основания АТФ образуют неполярные а.о. обеих долей (Val57 и Ala70 N-доли, и Leu173 C-доли). Плоская структура пуринового гетероцикла предполагает два типа взаимодействий с аминокислотным окружением: 1) гидрофобные силы притяжения между неполярными поверхностями, и 2) водородные связи с полярными фрагментами пептидной цепи, лежащими в плоскости колец. Если гидрофобные взаимодействия с поверхностью гидрофобной щели регулируют пространственное положение и подвижность аденинового гетероцикла, то водородные связи играют ключевую роль в процессе распознавания азотистого основания и определяют специфичность еРК в отношении АТФ/ГТР.

Аденин-связывающий участок, включающий фрагмент линкерного региона и начало αD-

спирали, располагается в глубине каталитической щели. Его основной функцией является распознавание фармакофорных атомов азота пуринового гетероцикла. Взаимодействуя с РКAc, азотистое основание АТФ образует две донорно-акцепторные пары с пептидной цепью линкерного региона. Водородная связь между NH₂-группой аденина и карбонилем пептидного скелета Glu121, вместе с водородной связью между N1 аденина и амидом пептидного скелета Val123, связывают пурин с линкерным регионом. Еще одна водородная связь возникает между N7 аденина и ОН-группой Thr183 Mg-связывающей петли [33]. Связывание АТФ критически зависит от взаимодействия с этим участком. РКAc не может использовать в качестве донора фосфата молекулу ГТР, несмотря на сходство трифосфатных групп, рибозы и пуринового гетероцикла.

В то же время конформационная пластичность нуклеотид-связывающего участка обеспечивает двойную специфичность каталитической субъединицы СК2 в отношении АТФ/ГТР [60]. У РКAc отрицательно заряженный Glu127 линкерного региона находится на расстоянии действия водородных связей с гидроксилами рибозы, тогда как эквивалентный ему Asp120 СК2α располагается на значительном удалении и не образует рибозного якоря. В результате ри-

боза приобретает способность перемещаться в пределах свободного пространства у входа в нуклеотид-связывающий карман [61]. Вместе с иной (чем у РКА) ориентацией гидрофобной щели это повышает подвижность ароматического гетероцикла относительно просторного линкерного региона, и при замене АТР на ГТР позволяет фармакофорным группам аденина/гуанина находиться на этом участке индивидуальный набор партнеров по водородным связям. Такая возможность исключена для РКА, поскольку Glu127 жестко фиксирует положение рибозы и ограничивает подвижность гетероцикла, а Phe327 С-хвоста РКА ограничивает пространство внутри нуклеотид-связывающего кармана [62, 63].

ПЕПТИД-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК

В отличие от универсального для всех протеинкиназ АТР-связывающего участка, пептид-связывающий участок должен обладать высокой специфичностью, поскольку каждая РК должна распознавать и фосфорилировать строго опре-

деленные белки. Селективность в отношении белков-субстратов обеспечивают переменные а.о. большей доли, вместе с консервативной Р+1-петлей, образующие участок связывания пептида.

Минимальный консенсусный мотив, характерный для субстратов РКА (RR-х-S/T), включает два положительно заряженных остатка (обычно Arg) в положениях Р-2 и Р-3 относительно сайта фосфорилирования [64] (рис. 5, а). В протонированной форме боковая цепь аргинина несет сильный положительный заряд. В распознавании положительно заряженных детерминант субстратов РКА ключевую роль играют кислые аминокислоты (преимущественно Glu), образующие катион-связывающие сайты на поверхности N-доли.

Одним из таких участков является кислый кластер (Asp328, Asp329, Glu331, Glu332, Glu333, Glu334), входящий в состав С-хвоста большой доли. Предполагается, что остатки Asp и Glu образуют ловушку, притягивающую щелочные субстанции [37]. Если пептид обладает свойствами субстрата РКА, его ключевые а.о. вступают во взаимодействие с анионными сай-

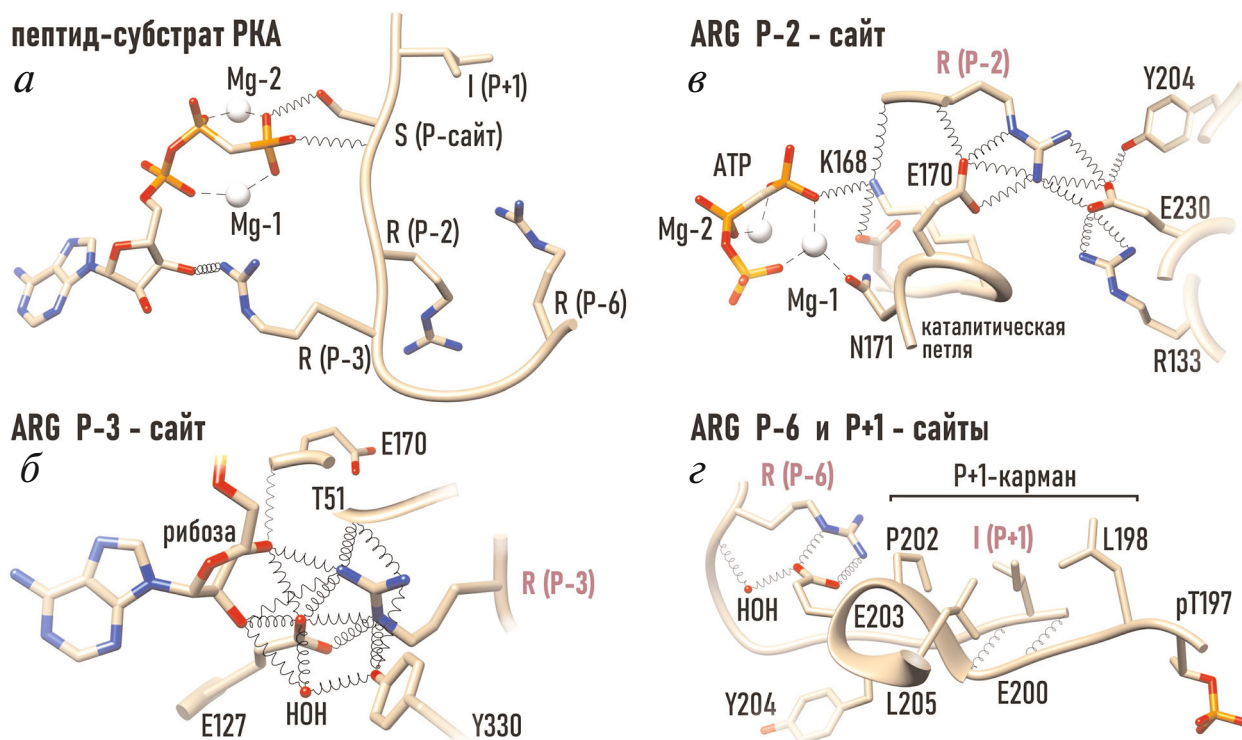


Рис. 5. Взаимодействие пептида с РКАс. а – Специфическими детерминантами субстратов РКА служат положительно заряженные боковые цепи аргинина в положениях Р-2, Р-3, и Р-6. В их распознавании ключевую роль играют кислые аминокислоты (Glu127, Glu170, Glu203, Glu230), образующие катион-связывающие сайты для (б) Arg Р-2, (в) Arg Р-3 и (г) Arg Р-6, которые вместе с Р+1-петлей образуют пептид-связывающий участок РКАс. PDB:4IAC.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тами и P+1-петлей и ориентируются в строго определенном порядке относительно активного центра. Локализованный посередине кислого кластера, Tyr330 вместе с консервативной молекулой воды образует сеть связей, соединяющих вместе: Arg P-3 пептидного субстрата, 2'ОН-группу рибозы АТР и Glu127 линкерного региона [37, 65, 66]. В результате этих взаимодействий Glu127 формирует ионную пару с Arg P-3, а Arg P-3 образует связь с 2'ОН-группой рибозы. Еще две связи Arg P-3 образует с карбонилем пептидного скелета Thr51 G-петли [43], координирующей положение β - и γ -фосфатов. Таким образом, молекула АТР и пептидный субстрат оказываются прочно привязанными друг к другу внутри активного центра (рис. 5, б).

Интеграцию между отдельными участками молекулы РКАс и косубстратами можно рассмотреть на примере P-2-связывающего сайта (рис. 5, в). С Arg P-2 пептидного субстрата непосредственно взаимодействует Glu230 α F-спирали; в свою очередь, положение Glu230 стабилизируют Tyr204 P+1-петли и Arg133 α D-спирали, в начале которой располагается P-3-связывающий Glu127. Вторую связь с Arg P-2 образует Glu170 каталитической петли. Одновременно Glu170 взаимодействует с 2'ОН-группой рибозы, а следующий за ним консервативный Asn171 подтягивает к активному центру АТР-связанный ион Mg-1 и Asp166 каталитической петли. Еще одну связь с амидом пептидного скелета Arg P-2 образует Lys168 каталитической петли, который вместе с Asn171 обеспечивает сопряжение пептида с γ -P и Mg-1 [33, 37, 64, 66].

Наряду с минимальным консенсусным мотивом, некоторые субстраты РКА содержат Arg в позиции P-6 (рис. 5, з). Распознавание Arg P-6 осуществляет Glu203 (вместе с консервативной молекулой воды), входящий в состав P+1-петли [37, 65].

К консервативным элементам пептид-связывающего участка ePK относится P+1-петля (198–208 а.о.), кэпирующая а.о. субстратного белка в положении P+1 относительно сайта фосфорилирования (рис. 5, з). У пептидных субстратов РКА, таких как кемпид (LRRASLG) или PKI₅₋₂₄ (TTYADFIASGRGTGRRAIHN), непосредственно после сайта фосфорилирования обычно размещается неполярный лейцин/изолейцин. Этот остаток укладывается в гидрофобный карман, который образуют боковые цепи неполярных аминокислот Leu198, Pro202 и Leu205 [37, 65]. Одновременно с этим основную цепь Ile P+1 фиксирует Gly200, а следующий за ним Thr201 (рис. 5, з) привязывает к P+1-петле Asp166 и Lys168 каталитической петли, обеспечивая тесный контакт фосфоакцепторных

Ser/Thr пептидного субстрата с γ -фосфатом АТР. В конечном итоге, P-сайт ориентируется внутри активного центра так, что ОН-группа Ser/Thr оказывается в радиусе действия водородных связей с γ -P-АТР и карбоксилем Asp166.

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ePK

Как ключевые компоненты внутриклеточной сигнализации, РК находятся под строгим контролем со стороны клеточного окружения, наиболее изученным механизмом которого является фосфорилирование [14, 16]. Из 112 РК, экспрессируемых *S. cerevisiae*, фосфорилированию подвержено 56, из которых 27 активируются посредством фосфорилирования Т-петли вышестоящей РК. Альтернативным механизмом является *цис/транс*-автофосфорилирование Т-петли (внутримолекулярное фосфорилирование или фосфорилирование соседней аналогичной РК). Так, активируются 10 РК, тогда как 19 РК имеют регуляторные Р-сайты за пределами Т-петли. И, наконец, дефосфорилирование служит механизмом активации/инактивации для 11 РК [67].

Иерархически организованные РК образуют сигнальные каскады, в которых одна РК фосфорилирует и активирует другую, как в каскаде MAPK/Erk [68]. На роль киназы РКА у млекопитающих претендует PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) [69, 70]. Связывание PDK1 с определенными фракциями фосфолипидов (плазматической, ядерной мембран) стимулирует кластеризацию и *транс*-автофосфорилирование PDK1 [71]. Благодаря этому свойству, PDK1 часто занимает место в верхних эшелонах AGC-киназ (РКА, PKB/Akt, PKC, SGK, и p70 S6R) и может быть *upstream*-киназой РКА. Не исключено также существование альтернативных механизмов активации РКА. Так, в бактериальных клетках, дефицитных по PDK, процессинг РКА осуществляется путем автофосфорилирования [72].

Клеточными антагонистами РК являются протеинфосфатазы (PP), осуществляющие дефосфорилирование белков. Этот антагонизм проявляется не только в отношении нижестоящих белков-мишеней, но и в отношении самих РК. В отличие от РКАс, у которой Thr197 не чувствителен к действию PP, многие ePK (PKB/Akt, I κ B-kinase, PKC, CaMK, Erk, CDK) могут быть инактивированы путем дефосфорилирования Ser/Thr-фосфатазой PP2A (во всяком случае *in vitro*) или образуют комплекс с PP2A [73].

Обратимое фосфорилирование представляет собой мощный механизм регуляции киназной активности, поэтому многие ePK имеют один или несколько Р-сайтов, расположенных в сегменте активации и подвижных N- и С-хвостах (рис. 1). У PKAc млекопитающих известно три таких сайта (Ser10, Thr197, Ser338). Ser10 входит в состав сегмента (Ser10-Glu-Gln-Glu13), кэпирующего α A-спираль, которая препятствует расхождению N- и С-долей. Автофосфорилирование Ser10 наблюдается только у *E. coli*; оно дестабилизирует N-хвост и приводит к инактивации РКА [72]. Ser338 РКА образует вершину (turn-motif) петли между двумя консервативными участками (FDDY и FxxF) подвижного С-хвоста и в фосфорилированной форме стабилизирует С-хвост, регулирующий доступ АТФ к каталитическому центру и положение N-конца α C-спирали [31]. Автофосфорилирование Ser338 РКА происходит в ходе трансляции. За исключением РКА и PKG все AGC-киназы имеют еще один сайт автофосфорилирования, следующий за FDDY. В фосфорилированной форме С-хвосты AGC-киназ приобретают способность к взаимодействию с PIF-pocket (PDK1-interacting fragment) PDK1 [58, 74]. В результате происходит аллостерическая активация PDK1 и PDK1-зависимое фосфорилирование Т-петли AGC-киназ (Thr197 РКА).

СБОРКА АКТИВНОГО ЦЕНТРА РКАс

Само название сегмент активации указывает на важную роль этого фрагмента в регуляции ePK. Центральное место в сегменте активации занимает Т-петля, содержащая фосфоакцепторный сайт (рис. 3). Фосфорилирование консервативных Ser/Thr или Tyr является ключевым событием в процессе активации многих ePK (CDK2/4, Raf1, Mek1, Erk2, PKC, CaMKI/IV, ISPK1, GSK3, InRK, PDGF, TK семейства Src) [35, 75]. У конституционно-активной PKC δ сайт фосфорилирования (Thr505) соседствует с «фосфомиметиком» Glu500, поэтому PKC δ не требует фосфорилирования для активации [76].

У РКАс сайт фосфорилирования Т-петли представлен консервативным Thr197. Присоединение отрицательно заряженного фосфата к Thr197 запускает цепь ионных, водородных и неполярных взаимодействий, которые ориентируют каталитическую петлю, Mg-связывающую петлю и Р+1-петлю в положениях, оптимальных для эффективного связывания косубстратов и катализа [62, 66]. В результате РК переходит в активную (каталитически-компетентную) конформацию (рис. 6). Существующие к настоящее-

му времени структуры тройного комплекса, где молекулы АТФ и пептида уже занимают свои места [3, 66] позволяют предложить сценарий сборки активного центра РКАс, в котором ключевые роли последовательно исполняют pThr197, Arg165, и Asp166 HRD-мотива.

В фосфорилированной форме Thr197 образует четыре полярных контакта, с Arg165 HRD-мотива, Lys189 β 9-структуры, Thr195 Т-петли, и His87 α C-спирали, отчетливо прослеживающихся в структурах всех активных РКАс (рис. 6, а). Роль «эффектора» в сборке активного центра выполняет HRD-мотив. HRD-мотив ePK содержит уникальную последовательность, обладающую крайне высоким потенциалом для полярных взаимодействий — два положительно заряженных остатка (His164 и Arg165), и отрицательно заряженный Asp166. У РКАс положение гистидина занимает неполярный Tyr164, который опосредует гидрофобный механизм сборки активного центра [49].

Формирование ионной пары pThr197–Arg165 имеет два важных последствия: нарушается распределение зарядов вокруг HRD-мотива, и изменяются координаты Tyr164, Arg165, и Asp166. Это стимулирует дальнейшую реорганизацию сегмента активации, в которой «ключевым игроком» становится Asp166. Иными словами, мобилизация HRD-мотива создает условия для новых полярных взаимодействий с участием Asp166, в результате которых к активному центру подтягиваются Р+1-петля и каталитическая петля.

Гидрофобный карман Р+1-петли, в котором размещается боковая цепь Ile пептидного субстрата, образуют три неполярные аминокислоты (Leu198, Pro202, и Leu205). Как видно из рис. 6, б, в тройном комплексе координаты Р+1-петли, с одной стороны, контролирует полярный pThr197, непосредственно контактирующий с Leu198; а с другой — Asp166, образующий связь с гидроксильной группой Thr201. Конформация Р+1-петли во многом зависит и от гидрофобных взаимодействий. Неполярные контакты Tyr204 (с Pro169 каталитической петли, Val226 и Leu227 α F-спирали и α E-спирали) прочно привязывают Р+1-петлю к гидрофобному ядру большой доли, создавая платформу для пептид-связывающего участка [37, 64, 77].

Растущая интеграция между различными частями молекулы приводит к формированию еще одной связи, которую образует Thr201 с Lys168. Наряду с цепочкой Asp166–Thr201–Lys168, положение каталитической петли стабилизируют еще две связи: связь pThr197 с Asp166, лежащим в основании каталитической петли; и связь Asp166 с Asn171, хелатирующим Mg-1.

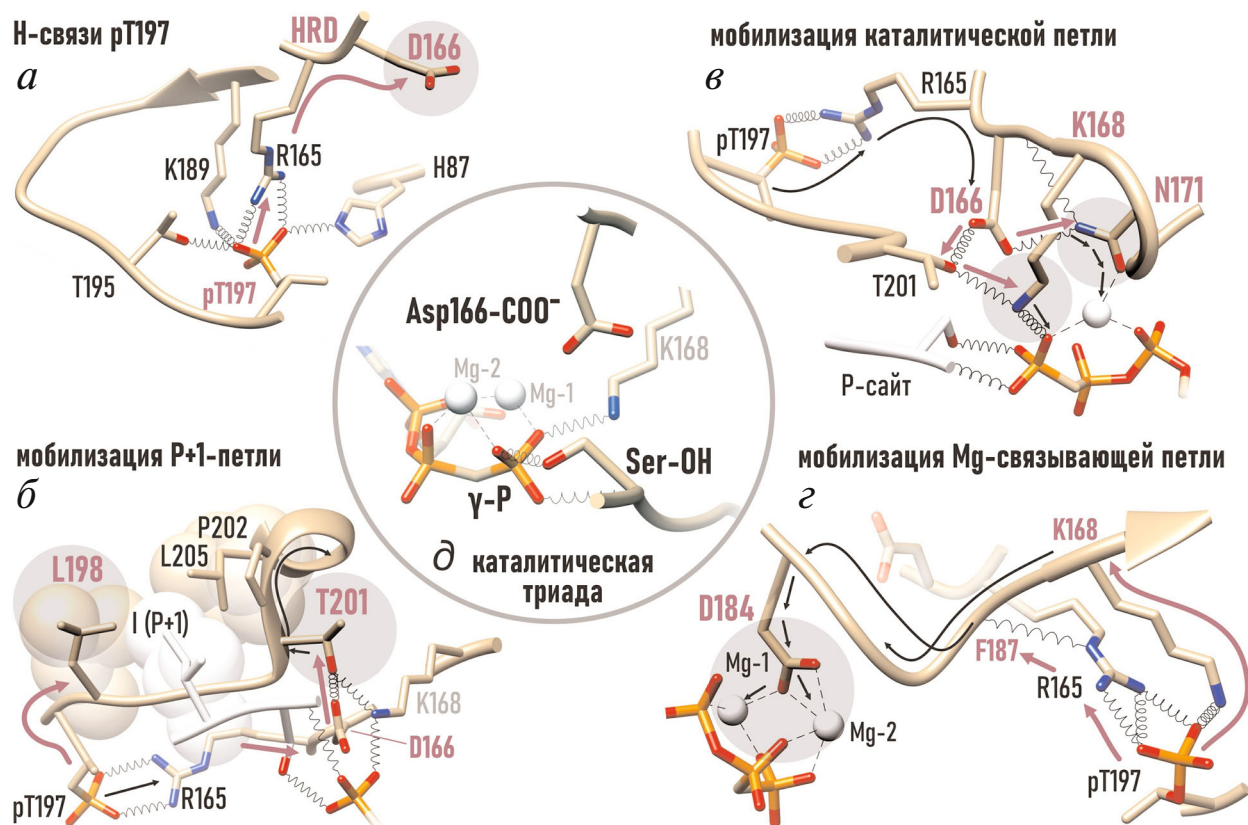


Рис. 6. Сборка активного центра РКAc. *а* – В фосфорилированной форме Thr197 образует четыре связи, стимулирующие мобилизацию; *б*) P+1-петли; *в*) каталитической петли; *г*) Mg-связывающей петли. В результате формируется (*д*) каталитическая триада: γ -фосфат АТР, гидроксил Ser/Thg белка-субстрата и карбоксил Asp166. Стрелочками (один цвет) обозначены цепочки связей, ведущие от pThr197 к ключевым а.о. активного центра и далее. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

В результате этих взаимодействий Asp166 и Lys168 каталитической петли занимают положения в непосредственной близости к будущему каталитическому сайту (рис. 6, *в*).

Мобилизацию Mg-связывающей петли осуществляет pThr197 совместными усилиями с Arg165 HRD-мотива. pThr197 формирует ионную пару с аминокислотой Lys189 β 9-структуры, на которую опирается Mg-связывающая петля, а боковая цепь Arg165 образует связь с карбонилем скелета Phe187 (рис. 6, *г*). В результате к активному центру подтягивается Asp184, хелатирующий два иона Mg (Mg-1 и Mg-2) в составе комплекса с АТР.

И, наконец, сборка активного центра заканчивается, и активированная РКAc приобретает способность к высокоаффинному связыванию АТР и пептидного субстрата. Учитывая высокую концентрацию АТР в клетке (5 мМ), предполагается, что первой с РКAc связывается молекула АТР [62]. Образуя множественные контакты с двумя долями, молекула АТР стимулирует их

схождение. При этом пептид-связывающий участок, расположенный у основания каталитической щели на поверхности большой доли, остается доступным; а АТР-связанная закрытая конформация РКAc стабилизируется соевым мостом pThr197–His87.

Дополнительные механизмы стабилизации активного центра включают правильную ориентацию подвижных элементов, таких как β 9-структура, α C-спираль и α A-спираль. Так, две связи: pThr197–Thr195 и pThr197–Lys189 привязывают к активному центру Т-петлю и β 9-структуру. В свою очередь, мобилизация β 9-структуры и реорганизация α C-спирали (Arg93, Gln96 и Arg190 которых образуют полярные границы «гидрофобного сустава») – упорядочивают положение α A-спирали, соединяющей две доли наподобие пружины [42, 50].

Таким образом, фосфорилирование Т-петли РКAc приводит в конечном итоге к формированию активного центра. Активный центр РКAc включает: АТР-связывающий участок, пептид-

связывающий участок, и собственно, каталитический сайт, содержащий химические группы, непосредственно участвующие в процессе катализа. В тройном комплексе основу каталитического сайта составляет каталитическая триада: γ -фосфат АТР, гидроксил Ser/Thr белка-субстрата, и карбоксил Asp166, (рис. 6, *д*). Непосредственное окружение каталитического сайта образуют два иона Mg, Lys168, Lys72 и амиды G-петли, которые компенсирует локальный отрицательный заряд, возникающий в ходе реакции.

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ФОСФОРИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ. РОЛЬ Asp166

Реакция переноса фосфата (перенос фосфорильной группы) происходит через образование промежуточного интермедиата (рис. 7), преимущественно по диссоциативному механизму [54, 78–82], и включает три этапа:

1) ориентация терминальных фосфатов и OH-группы Ser. В этом процессе участвуют Asp166, два иона магния и Lys168 каталитической петли. Важным аспектом каталитической реакции переноса фосфата является то, что электрофильность γ -P усиливается в результате взаимодействия с двумя ионами Mg. Положительно заряженные ионы металлов стабилизируют отрицательный заряд атомов кислорода, что приводит к увеличению дипольного момента фосфорно-кислородной связи. Поэтому P получает больший положительный заряд и становится лучшим электрофилом;

2) нуклеофильная атака атома фосфора гидроксидом Ser очень похожа на реакцию нуклеофильного замещения. В этой реакции участвуют

три компонента: богатый электронами нуклеофил, электронодефицитный электрофил и «уходящая» (отщепляемая) группа, в данном случае ADP.

Кислород гидроксиды является сильным нуклеофилом, он «атакует», т.е. притягивается к положительно заряженному центру γ -P, и стремится образовать новую ковалентную связь, предоставляя в общее пользование свободную пару электронов. В результате нуклеофильной атаки кислородный мостик между β - и γ -фосфатами разрывается, O принимает два электрона этой связи и «уходит» в депротонизированной форме в составе молекулы ADP. Его место занимает кислород OH-группы Ser белка-субстрата, замещая молекулу ADP, и инверсируя стереохимическую конфигурацию фосфатной группы [83, 54];

3) кислотно-щелочной катализ с участием Asp166. Ферменты являются уникальными биологическими катализаторами благодаря тому, что а.о. в окружении активного центра могут проявлять как кислотные, так и щелочные свойства. У РКА таким а.о. является Asp166, несущий карбоксильную группу. Для карбоксилата характерно смещение электронной плотности в сторону карбонильного кислорода и поляризация связи O–H. Благодаря этому, атом водорода легко диссоциирует в виде H^+ . В результате образуется высокореактивный карбоксилат-ион ($R-COO^-$), в котором отрицательный заряд равномерно распределяется между двумя атомами кислорода.

С самого начала Asp166 рассматривали в качестве кандидата на роль акцептора протона, повышающего нуклеофильные свойства OH-группы Ser [3, 51, 52]. Однако последующие исследования показали, что Asp166 не обладает

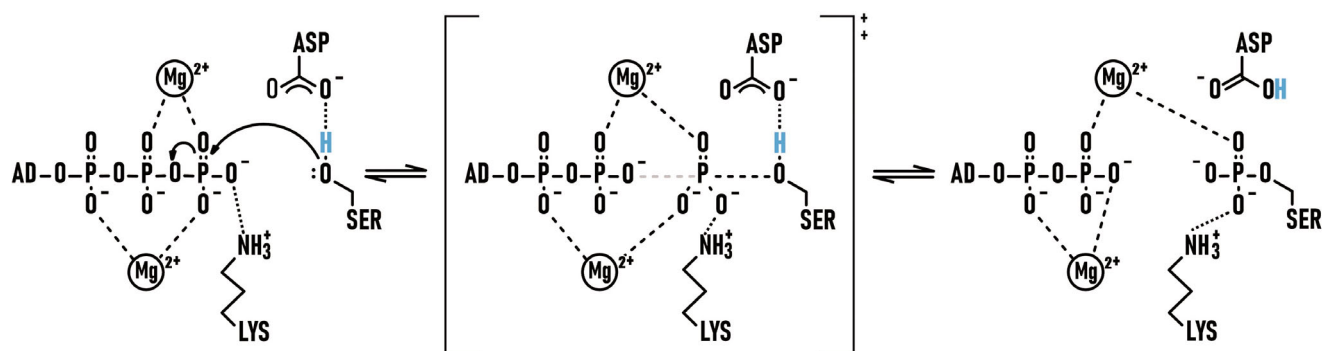


Рис. 7. Предполагаемый «in-line» механизм фосфорилтрансферазной реакции с образованием пентакоординированного промежуточного комплекса. Переходное состояние (в центре) имеет преимущественно диссоциативный характер; связь между β - и γ -P слабеет, а новая связь между γ -P и O-Ser начинает формироваться. AD – аденозин.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

достаточной щелочностью, чтобы катализировать отрыв протона, и его вклад на начальных стадиях реакции сводится к образованию водородной связи с гидроксидом Ser. Ограничивая вращения гидроксильной группы, она стабилизирует положение нуклеофила в непосредственной близости к электрофильному γ -фосфату, повышая продуктивность нуклеофильной атаки [53, 54, 78, 81].

Иная картина наблюдается в переходном состоянии (рис. 7), когда начинает формироваться нуклеофильная связь между γ -фосфатом и гидроксильным кислородом. В процессе формирования этой связи гидроксил теряет протоны, которые накапливаются в окружении Ser. Эти протоны захватывают Asp166, смещая химическую реакцию в сторону образования pSer. В дальнейшем, по всей вероятности, этот протон переходит к ADP, а Asp166 снова превращается в карбоксилат-анион [54, 84, 85]. Таким образом, «каталитический» Asp166 удерживает гидроксил Ser на ранних стадиях реакции, выполняет функции «протонной ловушки» на поздних стадиях и служит донором протона по ее завершении. Важную роль в стабилизации переходного состояния играют два иона Mg и Lys168, компенсирующие локальный отрица-

тельный заряд, возникающий в ходе реакции [54, 84]. Описанный механизм во многом является дискуссионным и может включать множественные формы переходных состояний [79].

СПИНОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ ePK

В последние годы получила распространение «спиновая концепция» строения ePK. Согласно этой модели, для полной активации ePK необходима сборка двух гидрофобных осей, названных регуляторным (R) и каталитическим (C) «спинами». Каждый спин состоит из нескольких неполярных остатков, расположенных в различных регионах, которые на уровне пространственной структуры формируют единый гидрофобный хребет [11, 49, 59]. Оба спина проходят через каталитическое ядро и соединяются между собой посредством α F-спирали, составляя внутренний гидрофобный скелет киназного домена (рис. 8).

R-спин PKAc (рис. 8, а) включает два гидрофобных остатка малой доли (Leu106 β 4-структуры и Leu95 α C-спирали) и два гидрофобных остатка большой доли (Phe185 DFG-мотива Mg-связывающей петли, и Tyr164 HRD-мотива ка-

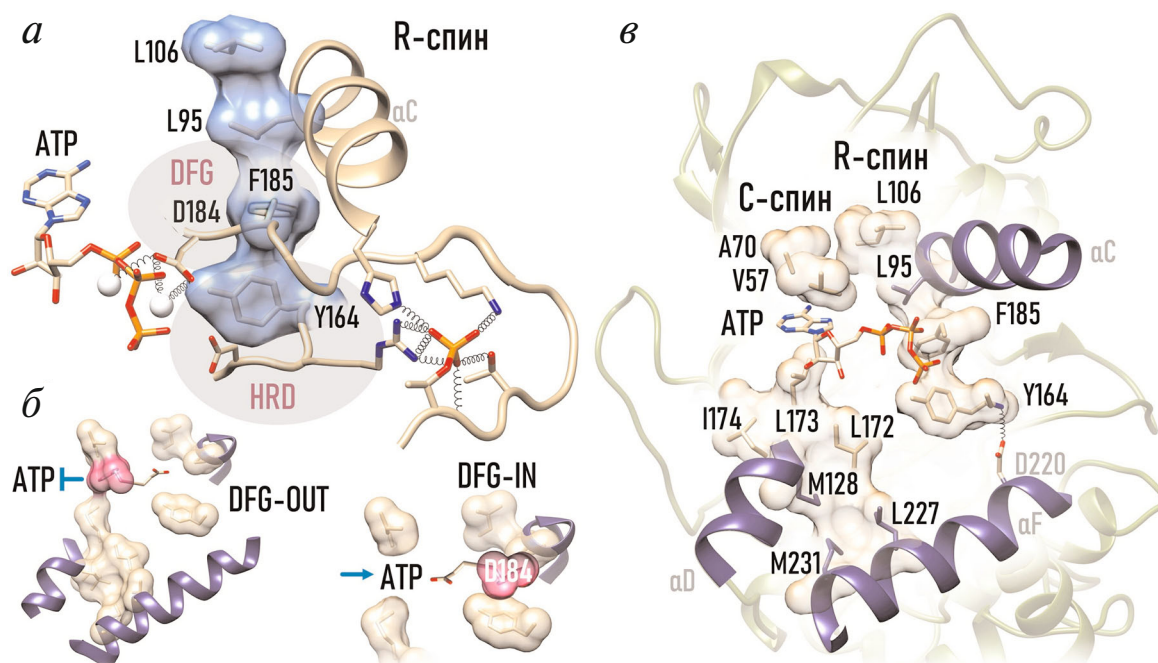


Рис. 8. Внутренний скелет PKAc образуют два гидрофобных спина. а — R-спин объединяет и координирует α C-спираль, DFG-мотив и HRD-мотив. В собранном R-спине Asp184 образует связи с двумя Mg^{2+} , а Phe185 находится в конформации DFG-In; б — у некоторых неактивных киназ Phe185 занимает положение DFG-Out, препятствуя связыванию АТФ. Фосфорилирование Т-петли стимулирует сборку R-спина; в — молекула АТФ занимает свое место, склеивая вместе верхний и нижний сегменты С-спина. PDB:1ATP.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

талитической петли). R-спин формируется в результате фосфорилирования T-петли [58] и отражает готовность активного центра к связыванию косубстратов. Индикатором сборки/разборки R-спина является положение Phe185 DFG-мотива. В собранном спине ароматическая боковая цепь Phe185 укладывается в гидрофобный карман, который образуют Leu106 и Leu95 малой доли, и Tyr164 большой доли. Положение Phe185 DFG-мотива в составе R-спина обозначается как «DFG-In». В этой конформации Asp184 DFG-мотива образует координационные связи с двумя ионами Mg, необходимые для правильной ориентации молекулы АТР. У синтезированных *de novo* нефосфорилированных киназ R-спин обычно состоит из трех отдельных сегментов. Положение Phe185 вне R-спина обозначается как «DFG-Out» и служит маркером неактивных форм ePK [47].

У некоторых PK (Akt, InRK, p38 MAP, MSK) Phe185 в конформации DFG-out располагается так, что стерически блокирует связывание АТР [86] (рис. 8, б). На стабилизацию неактивной конформации DFG-Out направлено действие Gleevec — ингибитора тирозинкиназ Abl/Src. Однако инактивация ePK не всегда требует конфигурации DFG-Out [46]. У ряда протеинкиназ R-спин разрушается другим путем, например, ротацией α C-спирали. Примерами служат неактивные формы Src и CDK2, у которых DFG-мотив находится в конформации DFG-In, а α C-спираль занимает положение « α C-Out» [87, 88].

С-спин РКАс (рис. 8, в) образуют гидрофобные остатки обеих долей, но для его сборки необходимо связывание молекулы АТР. В связанной форме плоский ароматический гетероцикл АТР располагается внутри гидрофобной щели. Возникающие при этом силы притяжения склеивают вместе верхний и нижний сегменты C-спина. Верхний сегмент образуют два небольших остатка малой доли (Val57 β 2-структуры и Ala70 β 3-структуры). Нижний сегмент включает Leu173 β 7-структуры и окружающие его Leu172 и Ile174, которые экранируют гидрофобный Met128 α D-спирали. В основании C-спина располагаются массивные Leu227 и Met231, входящие в состав α F-спирали. На протяжении каталитического цикла происходят динамические изменения C-спина [47]. C-спин разобщается при высвобождении молекулы ADP и вновь собирается при связывании новой молекулы АТР. В целом открытая конформация адаптирует киназу к эффективному захвату АТР. Этому способствуют: раскрытие каталитической щели, «введенное» положение G-петли, разблокировка аденин-связывающего кармана и преформированные регуляторные спины и активный центр.

Спиновая модель помогает идентифицировать а.о., занимающие ключевые пространственные позиции. К таким относится, например, Met120 линкерного региона РКАс. Располагаясь между спинами, Met120 контролирует доступ к аденин-связывающему карману, выполняя функции «привратника» [46]. Привратник может иметь громоздкую боковую цепь (как Phe у CDK2 или CK2 α) и затруднять проникновение лиганда, и наоборот, легкая цепь (как Thr у EGFR) повышает доступность аденин-связывающего участка. Мутации Met120 не влияют на киназную активность, но размеры привратника имеют значение при создании конкурентных ингибиторов АТР-связывающего участка [80].

Таким образом, гидрофобная природа спинов обеспечивает жесткое и очень динамичное сочленение между долями. Нуклеофильная атака и переходное состояние требуют стабильности киназного ядра и точной взаимориентации АТР и пептида; тогда как освобождение от продуктов реакции и захват новых косубстратов — предполагают координированные движения N- и C-долей и их отдельных компонентов. В этом плане спиновая модель прекрасно демонстрирует динамическую природу киназного цикла.

СТРУКТУРНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ДРАГ-ДИЗАЙН ИНГИБИТОРОВ ePK

С начала XXI в. РКА и другие ePK стали рассматриваться как вторые по важности (после GPCR) фармакологические мишени [89, 90]. К 2017 г. в США только для терапии рака применяли 37 ингибиторов PK, список которых постоянно растет [91, 92]. Наряду с онкологическими заболеваниями целый ряд других патологий (кардиологические, иммунологические, неврологические, метаболические, и инфекционные заболевания) прямо или опосредованно связаны с дисрегуляцией ePK [93–97]. Это вызывает неуклонный интерес к ePK и желание управлять их функциями.

Одним из новых подходов к созданию ингибиторов ePK является SBDD (structure-based drug design), на начальных этапах которого широко применяются методы *in silico*, а экспериментально тестируются только потенциально активные соединения [98]. Центральное место в структурно-ориентированных исследованиях занимает определение 3D-структуры белка-мишени (с помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР и т.п.). Возможности SBDD значительно расширяют моделирование 3D-структуры на основе гомологии с белками, чья структу-

ра уже известна, и моделирование различных конформаций белка-мишени. Следующим шагом является поиск участков на поверхности мишени, обладающих выгодной энергией взаимодействия с функциональными группами на молекулах-зондах, подобных лекарственным средствам. И наконец, проводят молекулярный докинг целевого сайта с уже известными соединениями из библиотек лигандов (виртуальный скрининг) или осуществляют дизайн *de novo*. Последний предполагает разработку соединения с нуля на основе сайта связывания. Наряду с интуицией химика для этого используют программы, позволяющие совмещать фрагменты известных ингибиторов или наращивать заместители на структуре-скаффолде.

Однако низкая селективность ингибиторов АТР-сайта (консервативного у всех ePK) и слабая биодоступность ингибиторов пептидной природы — затрудняют продвижение таких соединений [99]. В этой связи все большую актуальность приобретает таргетинг сайтов аллостерической регуляции ePK [100, 101], какими являются PIF-pocket PDK1 (PDB:4AW0), каталитическая петля и DFG-out pocket FAK (PDB:4EBV) и контактные сайты PH-домена Akt (PDB:4EJN), myristate-pocket ABL2 (PDB:3GVU) и др. [102]. Эти сайты располагаются за пределами АТР/пептид-свя-

зывающих участков и обеспечивают наиболее высокую селективность в действии ингибиторов, но выявляются случайно. Поэтому скрининг уникальных структур (полостей, карманов, расщелин) на основе 3D-моделей мог бы стимулировать создание эффективных ингибиторов ePK аллостерического действия.

Помимо медицинского применения, ингибиторы PK (как исследовательские инструменты) необходимы для изучения клеточных функций ePK в работе мозга, сердца и других органов, а также механизмов PK-опосредованной сигнализации при клеточном стрессе, адаптации, пролиферации и апоптозе. Так, атипичная PKC (PKM ζ) получила известность как «киназа памяти» благодаря работам с использованием высоко избирательного ингибиторного пептида [103]. Очевидно, что изучение структурных основ работы ePK является предпосылкой для успешного создания таких соединений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh, D. A., Perkins, J. P., and Krebs, E. G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3763–3765.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Science*, **253**, 407–414, doi: 10.1126/science.1862342.
- Zheng, J., Trafny, E. A., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F., and Sowadski, J. M. (1993) 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **49**, 362–365, doi: 10.1107/S0907444993000423.
- Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *FASEB J.*, **9**, 576–596.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., and Sowadski, J. M. (1992) cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family, *Faraday Discuss.*, **93**, 143–152, doi: 10.1039/fd9929300143.
- Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., Knighton, D. R., Ten Eyck, L. F., Sowadski, J. M., Herberg, F. W., Yonemoto, W., and Zheng, J. (1993) Crystal structures of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal general features of the protein kinase family, *Receptor.*, **3**, 165–172.
- Taylor, S. S., Zheng, J., Radzio-Andzelm, E., Knighton, D. R., Ten Eyck, L. F., Sowadski, J. M., Herberg, F. W., and Yonemoto, W. M. (1993) cAMP-dependent protein kinase defines a family of enzymes, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **340**, 315–324, doi: 10.1098/rstb.1993.0073.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S., and Zoller, M. J. (1993) A template for the protein kinase family, *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 84–89, doi: 10.1016/0968-0004(93)80001-r.
- Taylor, S. S., and Kornev, A. P. (2012) in: *Quantitative Biology: From Molecular to Cellular Systems* (Wall, M. E., ed.), CRC Press, pp. 267–298.
- Taylor, S. S., Zhang, P., Steichen, J. M., Keshwani, M. M., and Kornev, A. P. (2013) PKA: lessons learned after twenty years, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1271–1278, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.03.007.
- Taylor, S. S., Meharena, H. S., and Kornev, A. P. (2019) Evolution of a dynamic molecular switch, *IUBMB Life*, **71**, 672–684, doi: 10.1002/iub.2059.
- Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts, *J. Biol. Chem.*, **216**, 121–132.
- Северин Е. С., Кочеткова М. Н. (1985) Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности, Наука, Москва.
- Graves, J. D., and Krebs, E. G. (1999) Protein phosphorylation and signal transduction, *Pharmacol. Ther.*, **82**, 111–121, doi: 10.1016/s0163-7258(98)00056-4.
- Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation — a 25 year update, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 596–601, doi: 10.1016/s0968-0004(00)01712-6.
- Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and beyond, *Cell*, **100**, 113–127, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81688-8.
- Jeske, L., Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., and Schomburg, D. (2019) BRENDA in 2019: a european

- ELIXIR core data resource, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 542-549, doi: 10.1093/nar/gky1048.
18. Гусев Н. Б. (2000) Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль, *СОЖ*, **6**, 4-12.
 19. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome, *Science*, **298**, 1912-1934, doi: 10.1126/science.1075762.
 20. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks, *Cell*, **127**, 635-648, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.026.
 21. Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 361-370, doi: 10.1038/nrc1360.
 22. Bradshaw, J. M. (2010) The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches, *Cell Signal.*, **22**, 1175-1184, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.03.001.
 23. Gaestel, M. (2016) MAPK-activated protein kinases (MKs): novel insights and challenges, *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 88, doi: 10.3389/fcell.2015.00088.
 24. Waters, M. J. (2016) The growth hormone receptor, *Growth Horm. IGF Res.*, **28**, 6-10, doi: 10.1016/j.ghir.2015.06.001.
 25. Kim, J. J., Lorenz, R., Arold, S. T., Reger, A. S., Sankaran, B., Casteel, D. E., Herberg, F. W., and Kim, C. (2016) Crystal structure of PKG I: cGMP complex reveals a cGMP-mediated dimeric interface that facilitates cGMP-induced activation, *Structure*, **24**, 710-720, doi: 10.1016/j.str.2016.03.009.
 26. Isakov, N. (2018) Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression, *Semin. Cancer Biol.*, **48**, 36-52, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.012.
 27. Brzozowski, J. S., and Skelding, K. A. (2019) The multifunctional calcium/calmodulin stimulated protein kinase (CaMK) family: emerging targets for anti-cancer therapeutic intervention, *Pharmaceuticals (Basel)*, **12**, pii: E8, doi: 10.3390/ph12010008.
 28. Pawson, T., and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains, *Science*, **300**, 445-452, doi: 10.1126/science.1083653.
 29. Brown, N. R., Korolchuk, S., Martin, M. P., Stanley, W. A., Moukhametzianov, R., Noble, M. E. M., and Endicott, J. A. (2015) CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK, *Nat. Commun.*, **6**, 6769, doi: 10.1038/ncomms7769.
 30. Bibby, A. C., and Litchfield, D. W. (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 beta, *Int. J. Biol. Sci.*, **1**, 67-79, doi: 10.7150/ijbs.1.67.
 31. Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., and Kornev, A. P. (2012) Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 646-658, doi: 10.1038/nrm3432.
 32. Shabb, J. B. (2001) Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase, *Chem. Rev.*, **101**, 2381-2411.
 33. Bossemeyer, D., Engh, R. A., Kinzel, V., Ponstingl, H., and Huber, R. (1993) Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24), *EMBO J.*, **12**, 849-859.
 34. Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., and Anand, G. (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1697**, 259-269, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.11.029.
 35. Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, *Cell*, **85**, 149-158, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81092-2.
 36. Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1998) The eleventh datta lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases, *FEBS Lett.*, **430**, 1-11, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00606-1.
 37. Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M., and Taylor, S. S. (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase, *Chem. Rev.*, **101**, 2243-2270.
 38. Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S., and Eyck, L. F. (2006) Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17783-17788, doi: 10.1073/pnas.0607656103.
 39. Kornev, A. P., and Taylor, S. S. (2015) Dynamics-driven allostery in protein kinases, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 628-647, doi: 10.1016/j.tibs.2015.09.002.
 40. McClendon, C. L., Kornev, A. P., Gilson, M. K., and Taylor, S. S. (2014) Dynamic architecture of a protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E4623-E4631, doi: 10.1073/pnas.1418402111.
 41. Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X., Taylor, S. S., and Johnson, D. A. (1999) Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12394-12399, doi: 10.1073/pnas.96.22.12394.
 42. Herberg, F. W., Zimmermann, B., McGlone, M., and Taylor, S. S. (1997) Importance of the A-helix of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase for stability and for orienting subdomains at the cleft interface, *Protein Sci.*, **6**, 569-579, doi: 10.1002/pro.5560060306.
 43. Bossemeyer, D. (1994) The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element, *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 201-205, doi: 10.1016/0968-0004(94)90022-1.
 44. Grant, B. D., Hemmer, W., Tsigelny, I., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (1998) Kinetic analyses of mutations in the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase, *Biochemistry*, **37**, 7708-7715, doi: 10.1021/bi972987w.
 45. Aimes, R. T., Hemmer, W., and Taylor, S. S. (2000) Serine-53 at the tip of the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase: role in catalysis, P-site specificity, and interaction with inhibitors, *Biochemistry*, **39**, 8325-8332, doi: 10.1021/bi992800w.
 46. Taylor, S. S., and Kornev, A. P. (2011) Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 65-77, doi: 10.1016/j.tibs.2010.09.006.
 47. Kornev, A. P., and Taylor, S. S. (2010) Defining the conserved internal architecture of a protein kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 440-444, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.017.
 48. Steichen, J. M., Kuchinskas, M., Keshwani, M. M., Yang, J., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (2012) Structural basis for the regulation of protein kinase A by activation loop phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14672-14680, doi: 10.1074/jbc.M111.335091.
 49. Kim, J., Ahuja, L. G., Chao, F. A., Xia, Y., McClendon, C. L., Kornev, A. P., Taylor, S. S., and Veglia, G. (2017) A dynamic hydrophobic core orchestrates allostery in protein kinases, *Sci. Adv.*, **3**, e1600663, doi: 10.1126/sciadv.1600663.
 50. Taylor, S. S., Shaw, A. S., Kannan, N., and Kornev, A. P. (2015) Integration of signaling in the kinase: architecture and regulation of the αC Helix, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1567-1574, doi: 10.1016/j.bbapap.2015.04.007.
 51. Madhusudan, Trafny, E. A., Xuong, N. H., Adams, J. A., Ten Eyck, L. F., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1994) cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights

- into substrate recognition and phosphotransfer, *Protein Sci.*, **3**, 176-187, doi: 10.1002/pro.5560030203.
52. Zhou, J., and Adams, J. A. (1997) Is there a catalytic base in the active site of cAMP-dependent protein kinase? *Biochemistry*, **36**, 2977-2984, doi: 10.1021/bi9619132.
 53. Valiev, M., Kawai, R., Adams, J. A., Weare, J. H. (2003) The role of the putative catalytic base in the phosphoryl transfer reaction in a protein kinase: first-principles calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9926-9927, doi: 10.1021/ja029618u.
 54. Endicott, J. A., Noble, M. E., and Johnson, L. N. (2012) The structural basis for control of eukaryotic protein kinases, *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 587-613, doi: 10.1146/annurev-biochem-052410-090317.
 55. Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation, *Mol. Cell*, **15**, 661-675, doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.024.
 56. Hubbard, S. R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog, *EMBO J.*, **16**, 5572-5581, doi: 10.1093/emboj/16.18.5572.
 57. Wood, D. J., and Endicott, J. A. (2018) Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family, *Open Biol.*, **8**, pii: 180112, doi: 10.1098/rsob.180112.
 58. Gögl, G., Kornev, A. P., Reményi, A., and Taylor, S. S. (2019) Disordered protein kinase regions in regulation of kinase domain cores, *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 300-311, doi: 10.1016/j.tibs.2018.12.002.
 59. Kornev, A. P., Taylor, S. S., and Ten Eyck, L. F. (2008) A helix scaffold for the assembly of active protein kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14377-14382, doi: 10.1073/pnas.0807988105.
 60. Niefind, K., Putter, M., Guerra, B., Issinger, O. G., and Schomburg, D. (1999) GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1100-1103, doi: 10.1038/70033.
 61. Niefind, K., and Issinger, O. G. (2010) Conformational plasticity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 and its consequences for regulation and drug design, *Biochim. Biophys. Acta*, **804**, 484-492, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.022.
 62. Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N.-H., Ten Eyck, L. F., and Taylor, S. S. (2003) Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure, *J. Mol. Biol.*, **327**, 159-171, doi: 10.1016/s0022-2836(02)01446-8.
 63. Bastidas, A. C., Wu, J., and Taylor, S. S. (2015) Molecular features of product release for the PKA catalytic cycle, *Biochemistry*, **54**, 2-10, doi: 10.1021/bi500684c.
 64. Moore, M. J., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (2003) Structural basis for peptide binding in protein kinase A. Role of glutamic acid 203 and tyrosine 204 in the peptide-positioning loop, *J. Biol. Chem.*, **278**, 10613-10618, doi: 10.1074/jbc.M210807200.
 65. Shaltiel, S., Cox, S., and Taylor, S. S. (1998) Conserved water molecules contribute to the extensive network of interactions at the active site of protein kinase A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 484-491, doi: 10.1073/pnas.95.2.484.
 66. Gerlits, O., Weiss, K. L., Blakeley, M. P., Veglia, G., Taylor, S. S., and Kovalevsky, A. (2019) Zooming in on protons: neutron structure of protein kinase A trapped in a product complex, *Sci. Adv.*, **5**, eaav0482, doi: 10.1126/sciadv.aav0482.
 67. Rubenstein, E. M., and Schmidt, M. C. (2007) Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell*, **6**, 571-583, doi: 10.1128/EC.00026-07.
 68. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update, *Physiol. Rev.*, **92**, 689-737, doi: 10.1152/physrev.00028.2011.
 69. Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B. A., and Taylor, S. S. (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9849-9854, doi: 10.1073/pnas.95.17.9849.
 70. Moore, M. J., Kanter, J. R., Jones, K. C., and Taylor, S. S. (2002) Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. Autophosphorylation versus phosphorylation by phosphoinositide-dependent kinase-1, *J. Biol. Chem.*, **277**, 47878-47884, doi: 10.1074/jbc.M204970200.
 71. Di Blasio, L., Gagliardi, P. A., Puliafito, A., and Primo, L. (2017) Serine/threonine kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) as a key regulator of cell migration and cancer dissemination, *Cancers (Basel)*, **9**, 25, doi: 10.3390/cancers9030025.
 72. Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., and Taylor, S. S. (1997) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*, *Protein Eng.*, **10**, 915-925, doi: 10.1093/protein/10.8.915.
 73. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 186-191, doi: 10.1016/s0968-0004(99)01375-4.
 74. Xu, X., Chen, Y., Fu, Q., Ni, D., Zhang, J., Li, X., and Lu, S. (2019) The chemical diversity and structure-based discovery of allosteric modulators for the PIF-pocket of protein kinase PDK1, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **34**, 361-374, doi: 10.1080/14756366.2018.1553167.
 75. Newton, A. C. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm, *Biochem. J.*, **370**, 361-371, doi: 10.1042/BJ20021626.
 76. Stempka, L., Schnolzer, M., Radke, S., Rincke, G., Marks, F., and Gschwendt, M. (1999) Requirements of protein kinase cdelta for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643, *J. Biol. Chem.*, **274**, 8886-8892, doi: 10.1074/jbc.274.13.8886.
 77. Yang, J., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., and Taylor, S. S. (2004) Crystal structure of a cAMP-dependent protein kinase mutant at 1.26 Å: new insights into the catalytic mechanism, *J. Mol. Biol.*, **336**, 473-487, doi: 10.1016/j.jmb.2003.11.044.
 78. Adams, J. A. (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases, *Chem. Rev.*, **101**, 2271-2290, doi: 10.1021/cr000230w.
 79. Lassila, J. K., Zalatan, J. G., and Herschlag, D. (2011) Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 669-702, doi: 10.1146/annurev-biochem-060409-092741.
 80. Schwartz, P. A., and Murray, B. W. (2011) Protein kinase biochemistry and drug discovery, *Bioorg. Chem.*, **39**, 192-210, doi: 10.1016/j.bioorg.2011.07.004.
 81. Montenegro, M., Garcia-Viloca, M., Lluch, J. M., and González-Lafont, A. (2011) QM/MM study of the phosphoryl transfer to the Kemptide substrate catalyzed by protein kinase A. The effect of the phosphorylation state of the protein on the mechanism, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 530-539, doi: 10.1039/c0cp01062f.
 82. Wang, Z., and Cole, P. A. (2014) Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases, *Methods Enzymol.*, **548**, 1-21, doi: 10.1016/B978-0-12-397918-6.00001-X.
 83. Кочетков С. Н., Табиров А. Г., Северин Е. С. (1984) Механизмы переноса фосфорильной группы в ферментативных реакциях, *Биоорг. химия*, **10**, 1301-1325.
 84. Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G., and Johnson, L. N.

- (1999) Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies, *Biochemistry*, **38**, 14718–14730, doi: 10.1021/bi991454f.
85. Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N. H., and Taylor, S. S. (2002) Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 273–277, doi: 10.1038/nsb780.
 86. Shan, Y., Seeliger, M. A., Eastwood, M. P., Frank, F., Xu, H., Jensen, M. Ø., Dror, R. O., Kuriyan, J., and Shaw, D. E. (2009) A conserved protonation-dependent switch controls drug binding in the Abl kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 139–144, doi: 10.1073/pnas.0811223106.
 87. Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., and Harrison, S. C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism, *Mol. Cell*, **3**, 629–638, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80356-1.
 88. Huse, M., and Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases, *Cell*, **109**, 275–282, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00741-9.
 89. Cohen, P. (2002) Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 309–315, doi: 10.1038/nrd773.
 90. Рейхардт Б. А., Куликова О. Г., и Сапронов Н. С. (2002) Терапевтический потенциал модуляторов протеинкиназы CK2, *Вестник АМН*, **12**, 20–24.
 91. Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., and Rupasinghe, H. P. V. (2018) Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions, *Mol. Cancer*, **17**, 48, doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
 92. Kannaiyan, R., and Mahadevan, D. (2018) A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy, *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **18**, 1249–1270, doi: 10.1080/14737140.2018.1527688.
 93. Patterson, H., Nibbs, R., McInnes, I., and Siebert, S. (2014) Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, *Clin. Exp. Immunol.*, **76**, 1–10, doi: 10.1111/cei.12248.
 94. Castello, J., Ragnauth, A., Friedman, E., and Rebholz, H. (2017) CK2—an emerging target for neurological and psychiatric disorders, *Pharmaceuticals (Basel)*, **10**, 7, doi: 10.3390/ph10010007.
 95. Saad, N. S., Elnakish, M. T., Ahmed, A. A. E., and Janssen, P. M. L. (2018) Protein kinase A as a promising target for heart failure drug development, *Arch. Med. Res.*, **49**, 530–537, doi: 10.1016/j.arcmed.2018.12.008.
 96. Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H., and Benveniste, E. N. (2018) Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases, *Clin. Immunol.*, **189**, 4–13, doi: 10.1016/j.clim.2016.09.014.
 97. DuShane, J. K., and Maginnis, M. S. (2019) Human DNA virus exploitation of the MAPK-ERK cascade, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3427, doi: 10.3390/ijms20143427.
 98. Batool, M., Ahmad, B., and Choi, S. (2019) A structure-based drug discovery paradigm, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, pii: E2783, doi: 10.3390/ijms20112783.
 99. Roskoski, R. Jr. (2016) Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes, *Pharmacol. Res.*, **103**, 26–48, doi: 10.1016/j.phrs.2015.10.021.
 100. Eglen, R., and Reisine, T. (2011) Drug discovery and the human kinome: recent trends, *Pharmacol. Ther.*, **130**, 144–156, doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.007.
 101. Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., and Mathur, P. P. (2019) Targeting kinase interaction networks: a new paradigm in PPI based design of kinase inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.*, **19**, 467–485, doi: 10.2174/15680266190304155711.
 102. Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W., and Moebitz, H. (2015) Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2675–2700, doi: 10.1111/bph.13096.
 103. Бородинова А. А., Зюзина А. Б., и Балабан П. М. (2017) Роль атипичных протеинкиназ в поддержании долговременной памяти и синаптической пластичности, *Биохимия*, **82**, 372–388.

CATALYTIC SUBUNIT OF PKA AS A PROTOTYPE OF THE EUKARYOTIC PROTEIN KINASE FAMILY

Review

B. A. Reikhardt* and P. D. Shabanov

Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”,
197376 St. Petersburg, Russia; E-mail: reikhardt@mail.ru

Received October 21, 2019

Revised February 25, 2020

Accepted February 26, 2020

The PKA catalytic subunit (PKAc) is a practically isolated kinase domain that is conserved in all eukaryotic protein kinases. PKAc consists of two lobes that form the catalytic gap in which ATP-binding site, peptide-binding site, and catalytic site are located. During the folding, PKAc secondary structures are stacked so that the non-polar chains are assembled into a globular core, and the moving loops and tails are exposed out, to form regulatory elements. The synthesized *de novo* PKAc is processed by T-loop phosphorylation, and active center, capable to high affinity binding of co-substrates is formed. The ATP molecule “sticks” two lobes together, and the binding of peptide completes the assembly of the active center. As a result, the “catalytic triad” (gamma-phosphate of ATP, hydroxyl of Ser/Thr protein-substrate, and carboxyl of Asp166) occupies an optimal position for catalysis. During the catalytic cycle, the dynamic reorganization of polar and hydrophobic interactions ensures the transition of PKAc from open to closed conformation and vice versa. An understanding of ePK structural basis is essential for successful design of ePK modulators.

Keywords: PKA catalytic subunit, ATP binding site of PKA, peptide binding site of PKA, Thr197 PKA, hydrophobic spines

УДК 577.214

ТРАНСЛЕЗИОННЫЙ СИНТЕЗ ДНК И КАНЦЕРОГЕНЕЗ*

Обзор

© 2020 Е.С. Шилкин¹, Е.О. Болдинова¹, А.Д. Столяренко¹, Р.И. Гончарова²,
Р.Н. Чупров-Неточин³, Р.Ф. Хайруллин⁴, М.П. Смаль^{2**}, А.В. Макарова^{1**}

¹ Институт молекулярной генетики Российской академии наук,
123182 Москва, Россия; электронная почта: amakarova-img@yandex.ru

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072 Минск,
Республика Беларусь; электронная почта: m.smal@igc.by

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская область, Россия

⁴ Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия

Поступила в редакцию 04.12.2019

После доработки 20.02.2020

Принята к публикации 20.02.2020

В клетках млекопитающих под влиянием эндогенных и экзогенных факторов постоянно образуются десятки тысяч повреждений ДНК. Основным механизмом защиты клеток от повреждений, избежавших удаления системами репарации, является транслезионный синтез ДНК. ДНК-полимеразы йота (Pol ι), эта (Pol η), каппа (Pol κ) и зета (Pol ζ) эффективно включают нуклеотиды напротив повреждений, но обладают низкой точностью синтеза и являются источником мутаций в геномной ДНК. Нарушения в работе этих ДНК-полимераз повышают риск развития онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транслезионный синтез ДНК, повреждения ДНК, мутагенез, канцерогенез.

DOI: 10.31857/S032097252004003X

Одним из основных факторов запуска канцерогенного перерождения клеток являются соматические мутации в генах-онкосупрессорах и онкогенах. Источниками мутагенеза являются дезаминирование 5-метилцитозина и цитозина, ошибки репарации и репликации. Сбои в работе ферментов репарации и репликации приводят к ускоренному накоплению соматических мутаций [1].

Источником мутаций при репликации являются не только ошибки копирования неповрежденной ДНК, но и ошибки, вызванные спонтанными и индуцированными повреждениями. ДНК постоянно подвергается повреждениям, возникающим под действием разнообразных физических и химических факторов. Системы репарации эффективно удаляют повреждения ДНК, восстанавливая первоначаль-

ную структуру молекулы, но часть повреждений избегает репарации. Такие повреждения могут приводить к гибели клеток в результате блокирования репликации и остановки клеточного цикла, а также обладают мутагенными свойствами (многие типы повреждений оснований образуют водородные связи с основаниями, некомплементарными первичной неповрежденной последовательности) [2]. Некоторые повреждения обладают одновременно высокими мутагенными и цитотоксическими свойствами (например, апуриновые/апиримидиновые сайты (АП-сайты)).

Для защиты клеток от нерепарированных повреждений может запускаться альтернативный механизм — транслезионный синтез ДНК или «синтез через повреждение», при котором становится возможным синтез ДНК на поврежденных матрицах. Ключевую роль в этом процессе у млекопитающих играют специализированные транслезионные* ДНК-полимеразы

Принятые сокращения: ДНКП — ДНК-полимераза; СГМ — соматический гипермутагенез; ЭРО — эксцизионная репарация оснований; ММР — мисмэтч репарация.

* 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. 4, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

* Транслезионные ДНКП — это ДНКП, основной функцией которых в клетке принято считать синтез ДНК в поврежденных участках, и демонстрирующие высокую эффективность включения нуклеотидов напротив поврежденных оснований ДНК *in vitro* и *in vivo*.

(ДНКП): ДНКП зета (Pol ζ) В-семейства и ДНКП *iota* (Pol ι), *eta* (Pol η), *каппа* (Pol κ) и REV1 Y-семейства [2–5]. Транслезионные ДНКП обладают активным центром, нетребовательным к структуре матрицы, и эффективно включают нуклеотиды напротив повреждений, преодолевая блок репликации [5, 6]. Во многих случаях транслезионные ДНКП включают нуклеотиды, преимущественно комплементарные поврежденным основаниям. Такой синтез является достаточно точным и вносит существенный вклад в снижение мутаций, индуцированных факторами, повреждающими ДНК.

Тем не менее вследствие «толерантности» активного центра, отсутствия 3'-5'-экзонуклеазной корректирующей активности и использования неканонических взаимодействий при включении нуклеотидов точность синтеза ДНК у транслезионных ДНКП является низкой [5, 6]. Такая низкая точность неприемлема при синтезе неповрежденной ДНК. Активность высоко ошибочных ДНКП и их доступ к репликативной вилке жестко регулируются в клетке, а нарушение их работы (увеличение и снижение каталитической активности, а также нарушения доступа к репликативной вилке) может являться причиной ускоренного накопления мутаций и развития онкологических заболеваний. В настоящем обзоре рассмотрены основные функции Pol ζ , Pol ι , Pol η , Pol κ и REV1 и их возможная роль в канцерогенезе и защите от развития онкологических заболеваний.

ФУНКЦИИ ДНКП В КЛЕТКЕ

ДНКП человека относятся к нескольким семействам и характеризуются большим разнообразием, различаясь по биохимическим свойствам, точности копирования ДНК и функциям. Репликативные ДНКП В-семейства дельта (Pol δ), *эпсилон* (Pol ϵ) и *альфа* (Pol α) осуществляют синтез геномной ДНК с высокой точностью, что достигается за счет высокой селективности работы активного центра и наличия 3'-5'-корректирующей экзонуклеазной активности (в случае Pol δ и Pol ϵ) [7, 8]. Частота ошибок Pol δ и Pol ϵ при репликации (*in vivo* и *in vitro*) составляет всего 10^{-5} – 10^{-7} [8].

Репликативные ДНКП наталкиваются на повреждения ДНК, что часто приводит к остановке репликации и запускает каскад событий, приводящий к моноубиквитинированию фактора процессивности PCNA по остатку Lys164 и переключению синтеза на транслезионные ДНКП [5, 9]. Для эффективной работы ДНКП формируют транслесому — мультисубъ-

единичный комплекс, состоящий из ДНКП и регуляторных белков.

Согласно двухполимеразной модели, одна из ДНКП Y-семейства — йота (Pol ι), *эта* (Pol η) или *каппа* (Pol κ) — включает нуклеотиды напротив поврежденного участка, тогда как ДНКП зета (Pol ζ) продолжает синтез после поврежденного участка [4]. Pol ι , Pol η и Pol κ — это односубъединичные ферменты, обладающие очень низкой точностью синтеза на неповрежденных ДНК-матрицах (10^{-1} – 10^{-4}) и низкой процессивностью [10–12]. Эти ферменты являются ДНКП-«инсертерами» (ДНКП-«инсертер» — ДНКП, которая ограничивается включением только одного или нескольких нуклеотидов напротив поврежденного участка). Pol ι , Pol η и Pol κ характеризуются разными биохимическими свойствами, отличаются по эффективности и спектру включения нуклеотидов напротив разных повреждений и точности копирования ДНК. Несмотря на то, что разные транслезионные ДНКП специализируются на разных типах повреждений, они частично дублируют функции друг друга [2].

Поскольку ДНКП Y-семейства не всегда могут осуществить удлинение праймера после включения нуклеотида напротив поврежденного основания, дальнейший синтез, в том числе от неспаренных, свободных концов праймеров, обеспечивает ДНКП-«экстендер» Pol ζ (ДНКП-«экстендер» — ДНКП, которая продолжает синтез после повреждения) [4]. Pol ζ состоит из нескольких субъединиц: каталитической REV3 и регуляторных REV7 (в форме димера), POLD2 (p50) и POLD3 (p66) (рис. 1) [13–16]. Y-ДНКП REV1 обладает слабой ДНК-полимеразной активностью и включает dCMP напротив некоторых повреждений *in vitro*, но основная функция REV1 — регуляция активности и координация работы ДНКП при сборке транслесомы [3, 4]. REV1 участвует в белок–белковых взаимодействиях одновременно с Pol ζ , ДНКП Y-семейства и фактором процессивности PCNA [3, 4].

Кроме репликации в поврежденных участках ДНК-транслезионные ДНКП могут выполнять и другие функции в клетке. Pol κ осуществляет репаративный синтез ДНК в ходе эксцизионной репарации поврежденных нуклеотидов [17]. Pol ι и REV1 обладают дополнительной дезоксирибофосфатлиазной (дРФ-лиазной) активностью и, возможно, в ряде случаев Pol ι и REV1 могут замещать Pol β в ходе синтеза ДНК при эксцизионной репарации оснований (ЭРО) [18, 19]. Pol η и REV1 вовлечены в соматический гипермутагенез (СГМ) генов иммуноглобулинов в В-лимфоцитах [20–22].

Нарушение работы транслезионных ДНКП в организме является фактором повышенного

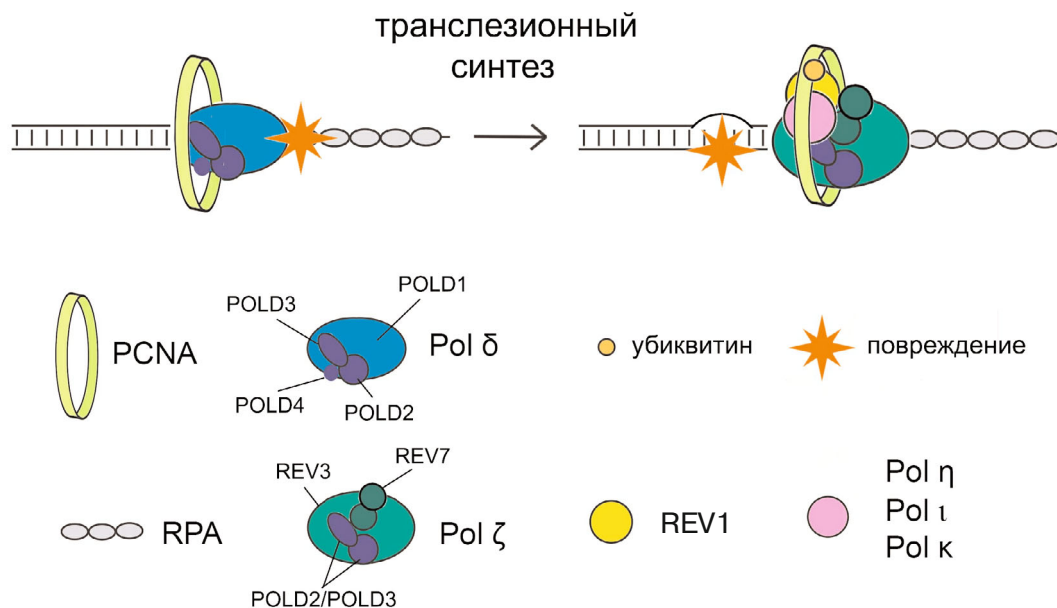


Рис. 1. Модель транслезионного синтеза ДНК. Переключение ДНКП и сборка транслесомы в участке ДНК с повреждением инициируется убиквитинилированием PCNA. Показаны основные белки и белок–белковые взаимодействия транслесомы человека: 1) регуляторные субъединицы POLD2/POLD3 являются общими для Pol δ и Pol ζ; 2) REV1 одновременно взаимодействует с убиквитинилированным PCNA, REV7 димером Pol ζ, а также ДНКП Y-семейства или POLD3 Pol ζ (С-конец REV1 и RIR мотив в Y-ДНКП и POLD3); 3) POLD3 Pol ζ взаимодействует с PCNA, REV7, а также REV1 или ДНКП Y-семейства. Альтернативное связывание REV1 RIR-мотивов Y-ДНКП и POLD3 может играть роль в переключении ДНКП-«инserter» и ДНКП-«экстендера». На рисунке не показаны взаимодействия ДНКП Y-семейства с PCNA [3, 4]. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

риска канцерогенного перерождения клеток. Опухольобразование может быть ассоциировано с падением уровня экспрессии и нарушением функций транслезионных ДНКП, а повышенная активность транслезионных ДНКП в опухоли может сопровождаться хромосомной нестабильностью и высокой смертностью пациентов из-за повышенной устойчивости опухолевых клеток к препаратам химиотерапии.

Нарушение функции с развитием наследуемых заболеваний у человека и мыши четко прослеживается для Pol η и Pol ζ [23–25]. Мутации и аминокислотные полиморфизмы других транслезионных ДНКП обнаруживаются как у здоровых людей, так и в образцах пациентов с разными онкологическими заболеваниями (Table S1 Приложения). Для некоторых полиморфизмов продемонстрирована ассоциация с высоким риском развития онкологических заболеваний и негативным прогнозом, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных прогностических маркеров.

Массовое секвенирование геномов позволило выявить наиболее часто встречаемые паттерны мутаций (мутационные подписи) в опухолях [26]. Ряд таких паттернов мутаций был связан с измененной активностью или нарушением функций определенных ДНКП.

Pol η

Основная функция Pol η в клетке состоит в эффективной и точной репликации через фотопродукты (тимин-тиминовые (Т-Т) циклобутановые димеры) и защите клеток от ультрафиолетового излучения [23]. Кроме Т-Т димеров Pol η эффективно включает нуклеотиды напротив АП-сайтов, 8-охо-G, тимидин гликоля [2], внутринитевых цисплатиновых сшивок [14, 27]. Потеря активности Pol η приводит у человека к развитию варианта пигментной ксеродермы (XP-V фенотип) — синдрома с аутосомально рецессивным наследованием, который характеризуется фотодерматозами и очень высокой частотой образования опухолей кожи [23]. У мышей потеря двух аллелей *Polh* вызывает плоскоклеточные карциномы кожи, индуцированные УФ, в 100% случаев, у гетерозиготных особей опухоли развиваются ~ в 30% случаев [28].

У пациентов с XP-V фенотипом описаны мутации и аминокислотные полиморфизмы, затрагивающие как каталитический кор (каталитический кор — содержащий активный центр каталитически активный фермент, лишенный С-концевой регуляторной области), так и С-концевую область Pol η, участвующую в белок–белковых взаимодействиях (Table S2 Приложения).

В среднем, мутации гена *POLH* повышают вероятность образования опухолей кожи в 1000 раз, а возраст появления опухолей составляет 20–30 лет. В большинстве случаев у пациентов одновременно образуются множественные меланомы, базальноклеточные и плоскоклеточные карциномы кожи (до нескольких десятков). Иногда заболевание сопровождается атипичным кератозом и множественными атипичными невусами; в литературе были описаны единичные случаи опухолей глаз, трихобластомы, нейрофибромы, кератоакантомы и иммунные дефекты (Table S2 Приложения).

Предполагается, что кроме защитной функции Pol η может способствовать накоплению мутационных изменений генома клеток, приводящих к возникновению злокачественных опухолей. Pol η участвует в СГМ генов иммуноглобулинов в А-Т парах [21, 22]. Мутации, характерные для Pol η , были обнаружены не только в В-лимфоцитах, но и во многих типах опухолей разной локализации и предполагается, что немиссенный мутагенез геномной ДНК, обусловленный Pol η , может быть связан с канцерогенезом [29].

Pol ι

Pol ι эффективно включает нуклеотиды с разной точностью напротив целого ряда поврежденных ДНК, вызванных эндогенными и экзогенными факторами: АП-сайтов, урацила и его производных, 8-охо-G, N3-me-A, O⁶-me-G, крупных аддуктов пуриновых оснований, блокирующих образование уотсон–криковских взаимодействий (например, 1,N⁶-этенoadенин и N²-ад-

дукты гуанина) [30, 31]. Включение нуклеотидов напротив повреждений, нарушающих образование уотсон–криковских взаимодействий, возможно благодаря использованию Pol ι хугстиновских взаимодействий [32, 33] (рис. 2).

Pol ι является ДНКП с очень низкой точностью синтеза на неповрежденной ДНК. Необычная особенность Pol ι — преимущественное включение dGMP напротив тимина, урацила и его производных [12, 34, 35]. Включение dGMP напротив тимина матричной ДНК стабилизируется уникальной водородной связью, которая образуется непосредственно между N²-атомом dGTP и Gln59 в активном центре Pol ι [33, 36]. Pol ι является также одной из немногих ДНКП, которая включает напротив АП-сайтов преимущественно не dAMP, а dGMP [2, 30, 35]. Эти свойства могут играть роль в снижении мутагенного потенциала дезаминированных остатков цитозина и его окисленных производных и 5-метилцитозина (5-me-C) (при AID/APOBEC-индуцированном мутагенезе и спонтанном дезаминировании 5-me-C CpG-островков) [35]. Одновременно дезаминированные и окисленные остатки цитозина составляют большую часть пиримидиновых повреждений в геномной ДНК, поэтому можно ожидать, что включение dGMP напротив неканонических пиримидинов в ходе транслезионного синтеза будет преимущественно антимутагенным. Однако роль Pol ι в снижении мутагенного потенциала дезаминированных остатков цитозина не подтверждена *in vivo*, и механизмы распознавания этих остатков не ясны.

Падение уровня экспрессии и/или активности Pol ι связано с развитием ряда онкологических заболеваний. У мышей ген *Pol ι* находится в локусе PAR2. Данный участок генома важен

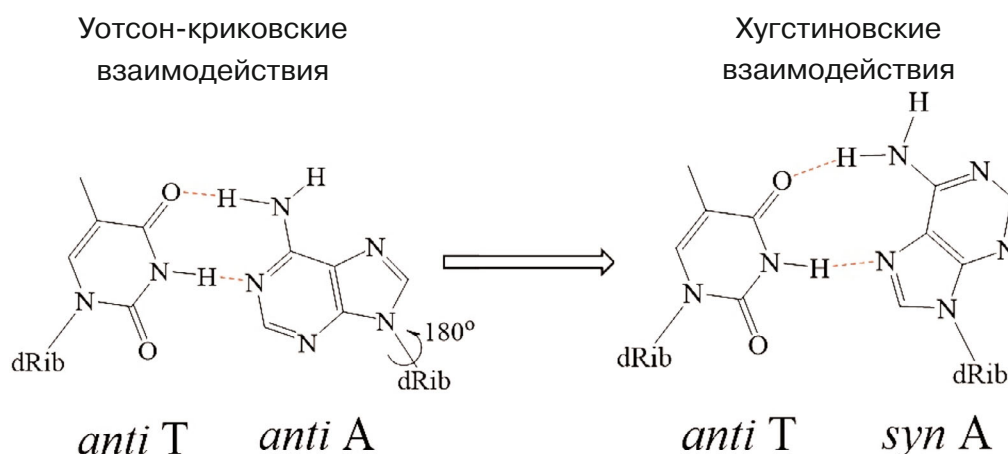


Рис. 2. Пример образования Хугстиновских взаимодействий в активном центре Pol ι .

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

для защиты от химически индуцированного рака легких [37–39]. Нокаут, а также альтернативный сплайсинг, мутации и полиморфизмы гена *Pol1*, снижающие активность фермента, связаны с высоким риском развития аденом и аденокарцином легких, индуцированных уретаном и диэтилнитрозамином [37–39]. Защитное действие *Pol1* продемонстрировано и при развитии опухолей кожи, индуцированных ультрафиолетом (в отсутствие *Pol1* образуются преимущественно мезенхимальные опухоли кожи) [40, 41].

Повышенный риск развития рака легких у человека ассоциирован с гетерозиготным и гомозиготным носительством варианта гена *POL1*, кодирующего фермент с аминокислотной заменой T706A (rs8305) (Table S1 Приложения). Повышенный риск появления опухолей простаты связан с заменами T706A и F507S (rs3218786) *Pol1* (Table S1 Приложения). Сильная ассоциация образования химерного гена *TMPRSS2-ERG* с аминокислотной заменой F507S была продемонстрирована у пациентов с раком простаты (Table S1 Приложения). Слияние промоторного элемента андроген-регулируемого гена протеазы *TMPRSS2* с протоонкогеном фактора транскрипции *ERG* может быть вызвано хромосомными перестройками и является одним из маркеров рака простаты [42]. С-концевые аминокислотные остатки Phe507 и Thr706 находятся в сайтах связывания убиквитинилированного PCNA (UBM1 и UBM2 соответственно) [43, 44] и могут нарушать взаимодействие *Pol1* с транс-лосомой. Вариант I236M *Pol1* может быть связан с развитием меланомы (Table S1 Приложения).

Увеличение экспрессии и/или активности *Pol1* у человека было отмечено в глиомах головного мозга [45], карциномах пищевода [46–48], опухолях молочной железы [49] и мочевого пузыря [50]. Высокий уровень экспрессии *Pol1* при раке пищевода, легких и груди может быть связан с высоким риском метастазирования и негативным прогнозом [46, 48, 51–53]. Индукция экспрессии *POL1* регулируется HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), стимулирующим сверхэкспрессию *POL1* в опухолевых клетках в условиях гипоксии [54]. Уровень экспрессии *POL1* в опухолях мочевого пузыря регулируется фактором транскрипции c-Jun и c-Jun-N-терминальной киназой, а также коррелирует со стадией заболевания [50].

Pol κ

Pol κ с различной эффективностью и точностью «проходит» широкий спектр поврежденный ДНК (АП-сайты, тимидин гликоль, 1, N⁶-

этенoadенин), но основной «мишенью» *Pol κ* считаются экспонированные в малую бороздку ДНК модификации нуклеотидов, прежде всего, крупные N²-аддукты гуанина, образующиеся под действием химических канцерогенов [55–59]. *Pol κ* снижает мутагенный потенциал распространенного канцерогена бенз[а]пирена, который содержится в жареных и копченых продуктах, табачном дыме, продуктах горения автомобильного топлива [60, 61]. Благодаря открытому активному центру *Pol κ* с очень высокой эффективностью и точностью включает напротив BPDE-N²-dG аддуктов, образующихся под влиянием бенз[а]пирена, dCMP, тогда как большинство ДНКП включает напротив BPDE-N²-dG, преимущественно dAMP, что вызывает G>T трансверсии [57]. Нокаут гена *Polκ* повышает частоту мутаций, индуцированных BPDE-N²-dG, в культуре клеток [62, 63].

Важно отметить, что защитная роль *Pol κ* от повреждений ДНК может быть связана и с еще неизвестной некаталитической функцией полимеразы. Клетки человека с геном, кодирующим каталитически неактивную *Pol κ*, и нокаутом гена *POLK* одинаково чувствительны к ряду повреждающих агентов, в том числе, бенз[а]пирену [64]. Кроме того, и нокаут *Polκ*, и каталитически неактивная *Pol κ* у мышей, ассоциированы с повышенным риском рака кишечника, индуцированного бенз[а]пиреном в присутствии DSS (агента, вызывающего воспаление). При такой обработке у мышей с геном *Polκ* дикого типа обнаружили аддукты ДНК с окисленными липидами (маркер воспаления), но продуктов бенз[а]пирена обнаружено не было [65].

Pol κ также осуществляет синтез напротив внутри- и межцепочечных сшивков ДНК, индуцированных цисплатином и митомицином C [66–68], участвует в репарации межнитевых сшивков ДНК [69, 70] и репаративном синтезе ДНК при эксцизионной репарации нуклеотидов [17].

Низкий уровень экспрессии *Pol κ* был обнаружен в опухолях прямой кишки, груди, легких и желудка [71, 72]. Повышенная экспрессия *POLK* вызывает повышение частоты мутагенеза в культурах клеток млекопитающих [73, 74]. Эктопическая сверхэкспрессия *Polκ* у мышей вызывает двухцепочечные разрывы ДНК, анеуплоидию и стимулирует канцерогенез у мышей с иммунодефицитом [75]. Высокая экспрессия *POLK* характерна для клеток пациентов с мелкоклеточным раком легких [76, 77] и коррелирует с инактивацией P53 [77]. Повышенная экспрессия *Pol κ* наблюдается также в глиомах и ассоциирована с поздними стадиями заболевания [45].

Для полиморфизмов *POLK* показана ассоциация с повышенным риском рака груди, а также

продемонстрировано их влияние на частоту рака легких (Table S1 Приложения). Соматические мутации гена *POLK* были обнаружены у 28% пациентов с раком простаты (Table S1 Приложения). Многие полиморфизмы были охарактеризованы биохимически. Подробнее о полиморфизмах *POLK* написано в обзоре [55].

Pol ζ

Pol ζ является единственной ДНКП человека, полноразмерный комплекс которой не выделен. Многосубъединичный комплекс Pol ζ человека, содержащий протяженную делецию каталитической субъединицы REV3, был выделен и охарактеризован в работе [14]. Показано, что Pol ζ в кооперации с Pol η очень эффективно осуществляют синтез напротив внутринитевых цисплатиновых сшивок [14]. Намного больше известно о свойствах Pol ζ *Saccharomyces cerevisiae*. С использованием дрожжевого фермента показано, что *in vitro* Pol ζ осуществляет эффективный транслезионный синтез в кооперации с Pol ι , Pol η и Pol κ человека для эффективной репликации напротив разных типов повреждений ДНК [3]. Кроме того, Pol ζ может включать нуклеотиды напротив ряда повреждений в качестве «ДНК-инserterа». Например, Pol ζ является основной ДНКП, осуществляющей высоко мутагенный транслезионный синтез напротив аддуктов, образующихся под влиянием канцерогенов афлатоксина В1 [78, 79] и аристоклиевой кислоты [80], которые могут попадать в организм с зараженными продуктами питания или травяными сборами, используемыми в народной медицине [81]. Мутагенез, вызванный этими агентами, является причиной развития опухолей печени и мочевого пузыря соответственно [82, 83]. Особенностью Pol ζ является генерация tandemных мутаций и мисмэтчей при синтезе на неповрежденной ДНК, а наиболее часто встречающимися заменами Pol ζ *in vivo* являются трансверсии G>C, G>T, G>A и T>A [3, 84].

Pol ζ занимает исключительно важную роль в репликации поврежденной ДНК. В отличие от ДНКП Y-семейства, функции которых взаимозаменяемы, потеря каталитической активности Pol ζ у мышей приводит к эмбриональной гибели, что указывает на роль Pol ζ в репликации большого числа эндогенных повреждений ДНК [85, 86]. Потеря функции REV3 у эмбрионов мыши сопровождается накоплением разрывов ДНК, хромосомной нестабильностью (транслокации и анеуплоидии), генерализованным p53-зависимым апоптозом, а клетки с мутациями *Rev3l* чрезвычайно чувствительны к агентам,

повреждающим ДНК [87–89]. Предполагается, что примерно 50% всех спонтанных мутаций зависит от Pol ζ [90].

Нарушение функций Pol ζ в организме связано с канцерогенезом [24, 25]. Тканеспецифичный кондиционный нокаут гена *Rev3l* у мышей в клетках эпидермиса приводит к хромосомной нестабильности, высокой частоте развития рака кожи и нарушению способности тканей к регенерации [25]. Снижение уровня экспрессии гена *REV3L* у человека, вероятно, связано с повышенным риском развития карциномы прямой кишки [91]. Полиморфизмы *REV3L* влияют на риск развития рака легких, груди, толстой и прямой кишки, а также связаны с негативным прогнозом заболеваний (Table S1 Приложения).

REV1

REV1 играет важную структурную и регуляторную роли при сборке транслесомы. REV1 одновременно содержит сайты связывания с ДНКП Y-семейства Pol ι , Pol η , Pol κ (через RIR-мотив) и несколькими субъединицами Pol ζ [91–95]. REV1 также взаимодействует с неубиквитинированным и моноубиквитинированным фактором процессивности PCNA [96, 97]. Наличие множества сайтов связывания с ДНКП и факторами репликации позволяет координировать работу ферментов репликации и своевременно обеспечивать переключение синтеза с высокоточных ДНКП на транслезионные ДНКП и с ДНКП-«инserterа» Y-семейства на процессивную Pol ζ . Таким образом, REV1 является ключевым регулятором репликации поврежденной ДНК.

REV1 обладает также слабой ДНК-полимеразной активностью и преимущественно включает dCMP напротив неповрежденных матричных нуклеотидов, AP-сайтов и N²-аддуктов гуанина [98–100]. REV1 осуществляет C>G/G>C трансверсии в ходе СГМ при созревании иммуноглобулинов в В-лимфоцитах [20], но, возможно, также вовлечен в немишенный мутагенез и в других клетках и органах (роль REV1 в СГМ подробнее будет рассмотрена в следующем разделе). Повышенный уровень экспрессии *Rev1* у мышей, подвергшихся воздействию N-метил-N-нитрозомочевина, вызывает REV1-зависимый мутагенез и индуцирует аденомы кишечника [101].

Подавление экспрессии *REV1* с помощью рибозима резко снижает частоту мутаций, индуцированных УФ и бенз[a]пиреном в культуре клеток [102, 103], а подавление *Rev1* экспрессии у мышей (доставка плазмиды для экспрессии ри-

бозима с помощью небулайзера) снижает частоту химически индуцированных опухолей легких [104]. Однако делеция С-концевого BRCA1-подобного домена REV1 (делеция не нарушает каталитическую активность, но приводит к потере ключевых белок–белковых взаимодействий в реплисоме) приводит к снижению мутагенеза, но более раннему появлению плоскоклеточных карцином кожи, индуцированных УФ [105].

Полиморфизмы *REV1* связаны с высоким риском развития ряда онкологических заболеваний. Аминокислотная замена N373S REV1 ассоциирована с высоким риском рака шейки матки, тогда как полиморфизм F257S (rs3087386) связан со сниженным риском развития рака шейки матки, но высоким риском развития рака легких и простаты (Table S1 Приложения). Биохимический анализ полиморфных вариантов REV1 показал, что вариант N373S обладает повышенной каталитической активностью при включении dCMP напротив неповрежденного G- и AP-сайтов (Table S1 Приложения). Для полиморфизмов rs6761390 и rs3792142 *REV1*, которые находятся в промоторной области и интроне 5 соответственно, показана связь с размером опухоли и стадией заболевания при раке груди (Table S1 Приложения).

ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ГИПЕРМУТАГЕНЕЗ

Дезаминирование цитозина цитидин-дезаминазой AID и последующее удаление урацила с образованием AP-сайтов играют ключевую роль в мутагенезе вариабельных областей генов иммуноглобулинов в В-лимфоцитах млекопитающих [106]. Мутации образуются преимущественно в мотивах $WRCY$ и WA ($W = A/T$, $R = A/G$, $Y = C/T$) несколькими способами: при включении dAMP напротив урацила, высокоошибочном транслезионном синтезе напротив AP-сайтов после удаления урацила урацил-ДНК-гликозилазой UNG2, в ходе ЭРО и неканонической мисмэтч репарации (ММР) [106].

REV1 осуществляет $G>C/C>G$ трансверсии при СГМ в ходе транслезионного синтеза, включая dCMP напротив AP-сайтов, образованных UNG2 [20]. Pol η осуществляет СГМ в А-Т парах. Pol η преимущественно ведет высокоошибочный синтез в ходе неканонической ММР репарации, индуцируя $A>G/T>C$ мутации при застраивании бреши, которую образует экзонуклеаза EXO1 после распознавания мисмэтча U-G комплексом MSH2/MSH6 [107, 108]. Кроме того, Pol η вносит мутации в А-Т парах в ходе длиннозаплаточного пути ЭРО после удаления урацила UNG2 и расщепления AP-сайта

АП-эндонуклеазой APE1 (MSH2/MSH6-независимый синтез) [109].

Гипермутагенез происходит не только в В-лимфоцитах. Дезаминирование цитозина в нелимфоидных тканях осуществляют AID и цитидин-дезаминазы APOBEC (APOBEC1, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3G). APOBEC-опосредованное дезаминирование защищает клетки от вирусной инфекции, ингибируя репликацию ретровирусов и обратную транскрипцию ретротранспозонов, а также дезаминирует остатки цитозина в геномной ДНК, что может играть роль в мутагенезе и канцерогенезе (в том числе при хронической вирусной инфекции) [110–112]. Спектр мутаций, осуществляемый REV1 и Pol η при СГМ генов иммуноглобулинов, совпадает со спектром мутаций во многих типах опухолей человека, что указывает на роль немишенного мутагенеза, индуцированного цитидин-дезаминазами AID/APOBEC и REV1/Pol η , в канцерогенезе [26, 29, 112]. Например, с действием цитидин-дезаминаз и REV1 связывают обнаруженные в опухолях паттерны мутаций #2 и #13, для которых характерны замены $C>T$ и $C>G$ [26, 112]. Предполагается, что $C>T$ транзиции образуются в результате включения dAMP напротив урацила (любыми ДНКП), тогда как $C>G$ трансверсии образуются при включении REV1 dCMP напротив AP-сайта после удаления урацила UNG2 [112]. AID преимущественно дезаминирует цитозин в мотиве WRC ($W = A/T$, $R = A/G$), APOBEC3G – в мотиве CCS , а APOBEC1, APOBEC3A и APOBEC3B – в мотиве TC [112]. Предположительно, Pol η осуществляет $A>G/T>C$ мутации в мотивах WA ($W = A/T$) в ходе неканонической ММР в активно транскрибируемых генах [29].

РЕПЛИКАЦИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК ПРАЙМАЗОЙ–ПОЛИМЕРАЗОЙ PRIMPOL

Кроме транслезионного синтеза в клетках существуют и другие механизмы, обеспечивающие толерантность клеток к повреждениям ДНК. В 2013 г. была впервые описана праймаза-полимераза человека PrimPol [113, 114]. PrimPol обнаружена в ядре и митохондриях и обладает одновременно ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностями [113]. PrimPol играет роль в защите клеток от многих повреждений ДНК. Предполагается, что PrimPol осуществляет реинициацию репликации после повреждений с помощью ДНК-праймазной активности [115–117]. В этом случае одноцепочечный участок с повреждением должен быть в дальнейшем репарирован. Кроме способности синтезировать ДНК *de novo* PrimPol

обладает также транслезионной активностью *in vitro* и эффективно «проходит» ряд распространенных повреждений ДНК, таких как 8-охо-G, формилурацил, АП-сайт [113, 118].

Было высказано предположение о том, что PrimPol проявляет антимутагенную роль в СГМ генов иммуноглобулинов и может нейтрализовать мутагенную активность цитидин-дезаминаз, снижая частоту С>G трансверсий в лидирующей цепи [116]. Антимутагенная активность PrimPol предполагает защитную роль в развитии онкологических заболеваний. Делеции *PRIMPOL* часто встречаются у пациентов с инвазивным раком груди, а количество точечных мутаций в опухолях с делецией *PRIMPOL* почти в два раза больше, чем опухолях без делеций [116]. PrimPol снижает частоту АРОВЕСЗВ-индуцированных мутаций, вызванных дезаминированием цитозина в ТрС-сайтах, в инвазивных опухолях груди [116]. Предполагается, что ре-инициация синтеза ДНК после АП-сайтов с помощью PrimPol ограничивает высоко ошибочный транслезионный синтез напротив АП-сайтов и стимулирует переключение на более точный механизм толерантности к повреждениям с участием гомологичной рекомбинации [116]. Схожий механизм с участием PrimPol может играть роль в снижении мутагенного потенциала крупных аддуктов. Показано, что PrimPol необходима для гомологичной рекомбинации фотопродуктов и аддуктов бенз[а]пирена [119].

Транслезионные ДНКП играют важную роль в обеспечении генетической стабильности, однако, защищая клетки от повреждений ДНК, они сами являются источником мутаций в организме. Накапливается все больше данных о вовлеченности высоко ошибочных транслезионных ДНКП не только в процессы канцерогенеза, но и в развитие резистентности опухолей к препаратам химиотерапии. Конкретные механизмы индукции мутагенеза и канцерогенеза, связанные с нарушением функций транслезионных ДНКП или их неконтролируемой активности, недостаточно ясны. Исследования клеток и животных с нокаутом генов ДНКП и сопоставление паттернов мутаций у онкологических пациентов и модельных объектов (с использованием последних достижений в области секвенирования генома и биоинформатики) являются важными направлениями дальнейших исследований.

Финансирование. Работа поддержана грантами: 1) разделы по ДНКП Y-семейства: РФФИ-комфи 17-00-00264 (АВМ), РФФИ-Бел-а 18-54-00024 (АВМ) и БРФФИ Б18Р-094 (МПС), 2) раздел по PrimPol: РФФИ 18-14-00354 (АВМ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Статья не содержит исследований, в которых участвовали люди, и экспериментов, выполненных с использованием животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Loeb, L. A., Loeb, K. R., and Anderson, J. P. (2003) Multiple mutations and cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 776-781, doi: 10.1073/pnas.0334858100.
- Игнатов А. В., Бондаренко К. А., Макарова А. В. (2017) Пути образования, репарации и репликации необъемных повреждений у человека, *Acta Naturae*, **9**, 45-60.
- Makarova, A. V., and Burgers, P. M. (2015) Eukaryotic DNA polymerase ζ , *DNA Repair (Amst)*, **29**, 47-55, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.012.
- Rizzo, A. A., and Korzhnev, D. M. (2019) The Rev1-Pol ζ translesion synthesis mutasome: Structure, interactions and inhibition, *Enzymes*, **45**, 139-181, doi: 10.1016/bs.enz.2019.07.001.
- Sale, J. E., Lehmann, A. R., and Woodgate, R. (2012) Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **13**, 141-152, doi: 10.1038/nrm3289.
- Yang, W., and Woodgate, R. (2007) What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15591-15598, doi: 10.1073/pnas.0704219104.
- Burgers, P. M. J., and Kunkel, T. A. (2017) Eukaryotic DNA replication fork, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 417-438, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044709.
- Kunkel, T. A. (2009) Evolving views of DNA replication (in)fidelity, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **74**, 91-101, doi: 10.1101/sqb.2009.74.027.
- Yang, K., Weinacht, C. P., and Zhuang, Z. (2013) Regulatory role of ubiquitin in eukaryotic DNA translesion synthesis, *Biochemistry*, **52**, 3217-3228, doi: 10.1021/bi400194r.
- Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F., and Kunkel, T. A. (2000) Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- η , *Nature*, **404**, 1011-1013, doi: 10.1038/35010014.
- Ohashi, E., Bebenek, K., Matsuda, T., Feaver, W. J., Gerlach, V. L., Friedberg, E. C., Ohmori, H., and Kunkel, T. A. (2000) Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DNB1 gene, *J. Biol. Chem.*, **275**, 39678-39684, doi: 10.1074/jbc.M005309200.
- Tissier, A., McDonald, J. P., Frank, E. G., and Woodgate, R. (2000) Poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase, *Genes Dev.*, **14**, 1642-1650.
- Baranovskiy, A. G., Lada, A. G., Siebler, H. M., Zhang, Y., Pavlov, Y. I., and Tahirov, T. H. (2012) DNA polymerase δ and ζ switch by sharing accessory subunits of DNA polymerase δ , *J. Biol. Chem.*, **287**, 17281-17287, doi: 10.1074/jbc.M112.351122.

14. Lee, Y. S., Gregory, M. T., and Yang, W. (2014) Human Pol ζ purified with accessory subunits is active in translesion DNA synthesis and complements Pol η in cisplatin bypass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2954-2959, doi: 10.1073/pnas.1324001111.
15. Makarova, A. V., Stodola, J. L., and Burgers, P. M. (2012) A four-subunit DNA polymerase ζ complex containing Pol δ accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11618-11626, doi: 10.1093/nar/gks948.
16. Rizzo, A. A., Vassel, F.-M., Chatterjee, N., D'Souza, S., Li, Y., Hao, B., Hemann, M. T., Walker, G. C., and Korzhnev, D. M. (2018) Rev7 dimerization is important for assembly and function of the Rev1/Pol ζ translesion synthesis complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 8191-8200, doi: 10.1073/pnas.1801149115.
17. Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R. M., Völker, M., Takenaka, K., Cloney, R., Nakazawa, Y., Niimi, A., Miki, Y., Jaspers, N. G., Mullenders, L. H., Yamashita, S., Foustier, M. I., and Lehmann, A. R. (2010) Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells, *Mol. Cell*, **37**, 714-727, doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.009.
18. Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Prasad, R., Wilson, S. H., Woodgate, R., and Kunkel, T. A. (2001) 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase ι *in vitro*, *Science*, **291**, 2156-2159, doi: 10.1126/science.1058386.
19. Prasad, R., Poltoratsky, V., Hou, E. W., and Wilson, S. H. (2016) Rev1 is a base excision repair enzyme with 5'-deoxyribose phosphate lyase activity, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 10824-10833, doi: 10.1093/nar/gkw869.
20. Jansen, J. G., Langerak, P., Tsaalbi-Shtylik, A., van den Berk, P., Jacobs, H., and de Wind, N. (2006) Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice, *J. Exp. Med.*, **203**, 319-323, doi: 10.1084/jem.2005227.
21. Zeng, X., Winter, D. B., Kasmer, C., Kraemer, K. H., Lehmann, A. R., and Gearhart, P. J. (2001) DNA polymerase η is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes, *Nat. Immunol.*, **2**, 537-541, doi: 10.1038/88740.
22. Rogozin, I. B., Pavlov, Y. I., Bebenek, K., Matsuda, T., and Kunkel, T. A. (2001) Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase η error spectrum, *Nat. Immunol.*, **2**, 530-536.
23. Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η , *Nature*, **399**, 700-704, doi: 10.1038/21447.
24. Wittschieben, J. P., Patil, V., Glushets, V., Robinson, L. J., Kusewitt, D. F., and Wood, R. D. (2010) Loss of DNA polymerase ζ enhances spontaneous tumorigenesis, *Cancer Res.*, **70**, 2770-2778, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4267.
25. Lange, S. S., Bedford, E., Reh, S., Wittschieben, J. P., Carbajal, S., Kusewitt, D. F., DiGiovanni, J., and Wood, R. D. (2013) Dual role for mammalian DNA polymerase ζ in maintaining genome stability and proliferative responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 687-696, doi: 10.1073/pnas.1217425110.
26. Alexandrov, L. B., Nik-Zainai, S., Wedge, D. C., Campbell, P. J., and Stratton, M. R. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer, *Nature*, **500**, 415-421, doi: 10.1038/nature12477.
27. Zhao, Y., Biertümpfel, C., Gregory, M. T., Hua, Y. J., Hanaoka, F., and Yang, W. (2012) Structural basis of human DNA polymerase η -mediated chemoresistance to cisplatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7269-7274, doi: 10.1073/pnas.1202681109.
28. Lin, Q., Clark, A. B., McCulloch, S. D., Yuan, T., Bronson, R. T., Kunkel, T. A., and Kucherlapati, R. (2006) Increased susceptibility to UV-induced skin carcinogenesis in polymerase η -deficient mice, *Cancer Res.*, **66**, 87-94, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1862.
29. Supek, F., and Lehner, B. (2017) Clustered mutation signatures reveal that error-prone DNA repair targets mutations to active genes, *Cell*, **170**, 534-547, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.003.
30. Макарова А. В., Кульбачинский А. В. (2012) Структура ДНК-полимеразы йота человека и механизм синтеза ДНК, *Биохимия*, **22**, 669-685, doi: 10.1134/S0006297912060016.
31. McIntyre, J. (2019) Polymerase ι — an odd sibling among Y family polymerases, *DNA Repair (Amst.)*, **86**, 102753, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102753.
32. Johnson, R. E., Prakash, L., and Prakash, S. (2005) Biochemical evidence for the requirement of Hoogsteen base pairing for replication by human DNA polymerase ι , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10466-10471, doi: 10.1073/pnas.0503859102.
33. Makarova, A. V., Ignatov, A., Miropolskaya, N., and Kulbachinskiy, A. (2014) Roles of the active site residues and metal cofactors in noncanonical base-pairing during catalysis by human DNA polymerase ι , *DNA Repair (Amst.)*, **22**, 67-76, doi: 10.1016/j.dnarep.2014.07.006.
34. Makarova, A. V., Grabow, C., Gening, L. V., Tarantul, V. Z., Tahirov, T. H., Bessho, T., and Pavlov, Y. I. (2011) Inaccurate DNA synthesis in cell extracts of yeast producing active human DNA polymerase ι , *PLoS One*, **6**, 16612, doi: 10.1371/journal.pone.0016612.
35. Vaisman, A., and Woodgate, R. (2001) Unique misinsertion specificity of pol ι may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines, *EMBO J.*, **20**, 6520-6529, doi: 10.1093/emboj/20.22.6520.
36. Kirouac, K. N., and Ling, H. (2009) Structural basis of error-prone replication and stalling at a thymine base by human DNA polymerase ι , *EMBO J.*, **28**, 1644-1654, doi: 10.1038/emboj.2009.122.
37. Iguchi, M., Osanai, M., Hayashi, Y., Koentgen, F., and Lee, G. H. (2014) The error-prone DNA polymerase ι provides quantitative resistance to lung tumorigenesis and mutagenesis in mice, *Oncogene*, **33**, 3612-3617, doi: 10.1038/onc.2013.331.
38. Lee, G. H., and Matsushita, H. (2005) Genetic linkage between Pol ι deficiency and increased susceptibility to lung tumors in mice, *Cancer Sci.*, **96**, 256-259, doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00042.x.
39. Wang, M., Devereux, T. R., Vikis, H. G., McCulloch, S. D., Holliday, W., Anna, C., Wang, Y., Bebenek, K., Kunkel, T. A., Guan, K., and You, M. (2004) Pol ι is a candidate for the mouse pulmonary adenoma resistance 2 locus, a major modifier of chemically induced lung neoplasia, *Cancer Res.*, **64**, 1924-1931, doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3080.
40. Dumstorf, C. A., Clark, A. B., Lin, Q., Kissling, G. E., Yuan, T., Kucherlapati, R., McGregor, W. G., and Kunkel, T. A. (2006) Participation of mouse DNA polymerase ι in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18083-18088, doi: 10.1073/pnas.0605247103.
41. Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Tsukamoto, T., Yamada, A., Sugimoto, T., Kanao, R., Higashi, Y., Kondoh, H., Tatematsu, M., Masutani, C., and Hanaoka, F. (2006) UV-B radiation induces epithelial tumors in mice

- lacking DNA polymerase ϵ and mesenchymal tumors in mice deficient for DNA polymerase ι , *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7696-7706, doi: 10.1128/MCB.01076-06.
42. Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M. et al. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer, *Science*, **310**, 644-648, doi: 10.1126/science.1117679.
43. Bienko, M., Green, C. M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A. R., Hofmann, K., and Dikic, I. (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis, *Science*, **310**, 1821-1824, doi: 10.1126/science.1120615.
44. Bomar, M. G., D'Souza, S., Bienko, M., Dikic, I., Walker, G. C., and Zhou, P. (2010) Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases ι and Rev1, *Mol. Cell*, **37**, 408-417, doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.038.
45. Wang, H., Wu, W., Wang, H. W., Wang, S., Chen, Y., Zhang, X., Yang, J., Zhao, S., Ding, H. F., and Lu, D. (2010) Analysis of specialized DNA polymerases expression in human gliomas: association with prognostic significance, *Neuro Oncol.*, **12**, 679-686, doi: 10.1093/neuonc/nop074.
46. Sun, H., Zou, S., Zhang, S., Liu, B., Meng, X., Li, X., Yu, J., Wu, J., and Zhou, J. (2015) Elevated DNA polymerase ι (poli) is involved in the acquisition of aggressive phenotypes of human esophageal squamous cell cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 3591-3601.
47. Zhou, J., Zhang, S., Xie, L., Liu, P., Xie, F., Wu, J., Cao, J., and Ding, W. Q. (2012) Overexpression of DNA polymerase ι (Pol ι) in esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Sci.*, **103**, 1574-1579, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02309.x.
48. Zou, S., Shang, Z. F., Liu, B., Zhang, S., Wu, J., Huang, M., Ding, W. Q., and Zhou, J. (2016) DNA polymerase ι (Pol ι) promotes invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, **7**, 32274-32285, doi: 10.18632/oncotarget.8580.
49. Yang, J., Chen, Z., Liu, Y., Hickey, R. J., and Malkas, L. H. (2004) Altered DNA polymerase ι expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis, *Cancer Res.*, **64**, 5597-5507, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0603.
50. Yuan, F., Xu, Z., Yang, M., Wei, Q., Zhang, Y., Yu, J., Zhi, Y., Liu, Y., Chen, Z., and Yang, J. (2013) Overexpressed DNA polymerase ι regulated by JNK/c-Jun contributes to hypermutagenesis in bladder cancer, *PLoS One*, **8**, 69317, doi: 10.1371/journal.pone.0069317.
51. He, C., Wu, S., Gao, A., Su, Y., Min, H., Shang, Z. F., Wu, J., Yang, L., Ding, W. Q., and Zhou, J. (2017) Phosphorylation of ETS-1 is a critical event in DNA polymerase ι -induced invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Sci.*, **108**, 2503-2510, doi: 10.1111/cas.13399.
52. Li, L., Tian, H., Cheng, C., Li, S., Ming, L., and Qi, L. (2018) siRNA of DNA polymerase ι inhibits the migration and invasion in the lung cancer cell A549, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **50**, 929-933, doi: 10.1093/abbs/gmy089.
53. Zou, S., Xu, Y., Chen, X., He, C., Gao, A., Zhou, J., and Chen, Y. (2019) DNA polymerase ι (Pol ι) promotes the migration and invasion of breast cancer cell via EGFR-ERK-mediated epithelial to mesenchymal transition, *Cancer Biomarkers*, **24**, 363-370, doi: 10.3233/CBM-181516.
54. Ito, A., Koshikawa, N., Mochizuki, S., Omura, K., and Takenaga, K. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 mediates the expression of DNA polymerase ι in human tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 306-311, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.048.
55. Stern, H. R., Sefcikova, J., Chaparro, V. E., and Beuning, P. J. (2019) Mammalian DNA polymerase κ activity and specificity, *Molecules*, **24**, 2805, doi: 10.3390/molecules24152805.
56. Choi, J. Y., Angel, K. C., and Guengerich, F. P. (2006) Translesion synthesis across bulky N2-alkyl guanine DNA adducts by human DNA polymerase κ , *J. Biol. Chem.*, **281**, 21062-21072, doi: 10.1074/jbc.M602246200.
57. Jha, V., Bian, C., Xing, G., and Ling, H. (2016) Structure and mechanism of error-free replication past the major benzo[a]pyrene adduct by human DNA polymerase κ , *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4957-4967, doi: 10.1093/nar/gkw204.
58. Yasui, M., Dong, H., Bonala, R. R., Suzuki, N., Ohmori, H., Hanaoka, F., Johnson, F., Grollman, A. P., and Shibutani, S. (2004) Mutagenic properties of 3-(deoxyguanosin-N2-yl)-2-acetylaminofluorene, a persistent acetylaminofluorene-derived DNA adduct in mammalian cells, *Biochemistry*, **43**, 15005-15013, doi: 10.1021/bi048279+.
59. Yuan, B., Cao, H., Jiang, Y., Hong, H., and Wang, Y. (2008) Efficient and accurate bypass of N2-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine by DinB DNA polymerase *in vitro* and *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 8679-8684, doi: 10.1073/pnas.0711546105.
60. Lee, B. M., and Shim, G. A. (2007) Dietary exposure estimation of benzo[a]pyrene and cancer risk assessment, *J. Toxicol. Env. Heal. A*, **70**, 1391-1394, doi: 10.1080/15287390701434182.
61. Hecht, S. S. (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**, 1194-1210, doi: 10.1093/jnci/91.14.1194.
62. Avkin, S., Goldsmith, M., Velasco-Miguel, S., Geacintov, N., Friedberg, E. C., and Livneh, Z. (2004) Quantitative analysis of translesion DNA synthesis across a benzo[a]pyrene-guanine adduct in mammalian cells: the role of DNA polymerase κ , *J. Biol. Chem.*, **279**, 53298-53305, doi: 10.1074/jbc.M409155200.
63. Ogi, T., Shinkai, Y., Tanaka, K., and Ohmori, H. (2002) Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15548-15553, doi: 10.1073/pnas.222377899.
64. Kanemaru, Y., Suzuki, T., Niimi, N., Gruz, P., Matsumoto, K., Adachi, N., Honma, M., and Nohmi, T. (2015) Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase κ in the protection of human cells against genotoxic stresses, *Environ. Mol. Mutagen.*, **56**, 650-662, doi: 10.1002/em.21961.
65. Hakura, A., Sui, H., Sonoda, J., Matsuda, T., and Nohmi, T. (2019) DNA polymerase κ counteracts inflammation-induced mutagenesis in multiple organs of mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, **60**, 320-330, doi: 10.1002/em.22272.
66. Ho, T. V., Guainazzi, A., Derkunt, S. B., Enoiu, M., and Scharer, O. D. (2011) Structure-dependent bypass of DNA interstrand crosslinks by translesion synthesis polymerases, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7455-7464, doi: 10.1093/nar/gkr448.
67. Jha, V., and Ling, H. (2018) Structural basis for human DNA polymerase κ to bypass cisplatin intrastrand cross-link (Pt-GG) lesion as an efficient and accurate extender, *J. Mol. Biol.*, **430**, 1577-1589, doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.023.
68. Kanemaru, Y., Suzuki, T., Sassa, A., Matsumoto, K., Adachi, N., Honma, M., Numazawa, S., and Nohmi, T. (2017) DNA polymerase κ protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free

- translesion DNA synthesis, *Genes Environ.*, **39**, 6, doi: 10.1186/s41021-016-0067-3.
69. Williams, H. L., Gottesman, M. E., and Gautier, J. (2012) Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks, *Mol. Cell*, **47**, 140-147, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.001.
 70. Zhuo, M., Gorgun, M. F., and Englander, E. W. (2017) Translesion synthesis DNA polymerase kappa is indispensable for DNA repair synthesis in cisplatin exposed dorsal root ganglion neurons, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2506-2515, doi: 10.1007/s12035-017-0507-5.
 71. Lemée, F., Bavoux, C., Pillaire, M. J., Bieth, A., Machado, C. R., Pena, S. D., Guimbaud, R., Selves, J., Hoffmann, J. S., and Cazaux, C. (2007) Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase kappa in colorectal cancer, *Oncogene*, **26**, 3387-3394.
 72. Pan, Q., Fang, Y., Xu, Y., Zhang, K., and Hu, X. (2005) Down-regulation of DNA polymerases kappa, eta, iota, and zeta in human lung, stomach, and colorectal cancers, *Cancer Lett.*, **217**, 139-147, doi: 10.1016/j.canlet.2004.07.021.
 73. Ogi, T., Kato, T. Jr., Kato, T., and Ohmori, H. (1999) Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the *Escherichia coli* mutagenesis protein din B, *Genes Cells*, **4**, 607-618, doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00289.x.
 74. Bergoglio, V., Bavoux, C., Verbiest, V., Hoffmann, J. S., and Cazaux, C. (2002) Localisation of human DNA polymerase kappa to replication foci, *J. Cell Sci.*, **115**, 4413-4418, doi: 10.1242/jcs.00162.
 75. Bavoux, C., Leopoldino, A. M., Bergoglio, V., O-Wang, J., Ogi, T., Bieth, A., Judde, J. G., Pena, S. D., Poupon, M. F., Helleday, T., Tagawa, M., Machado, C., Hoffmann, J. S., and Cazaux, C. (2005) Up-regulation of the error-prone DNA polymerase {kappa} promotes pleiotropic genetic alterations and tumorigenesis, *Cancer Res.*, **65**, 325-330.
 76. O-Wang, J., Kawamura, K., Tada, Y., Ohmori, H., Kimura, H., Sakiyama, S., and Tagawa, M. (2001) DNA polymerase kappa, implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer, *Cancer Res.*, **61**, 5366-5369.
 77. Wang, Y., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M., and O-Wang, J. (2004) Elevated expression of DNA polymerase kappa in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53, *Int. J. Oncol.*, **25**, 161-165.
 78. Lin, Y. C., Li, L., Makarova, A. V., Burgers, P. M., Stone, M. P., and Lloyd, R. S. (2014) Molecular basis of aflatoxin-induced mutagenesis-role of the aflatoxin B1-formamidopyrimidine adduct, *Carcinogenesis*, **35**, 1461-1468, doi: 10.1093/carcin/bgu003.
 79. Lin, Y. C., Owen, N., Minko, I. G., Lange, S. S., Tomida, J., Li, L., Stone, M. P., Wood, R. D., McCullough, A. K., and Lloyd, R. S. (2016) DNA polymerase ζ limits chromosomal damage and promotes cell survival following aflatoxin exposure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13774-13779, doi: 10.1073/pnas.1609024113.
 80. Hashimoto, K., Bonala, R., Johnson, F., Grollman, A. P., and Moriya, M. (2016) Y-family DNA polymerase-independent gap-filling translesion synthesis across aristolochic acid-derived adenine adducts in mouse cells, *DNA Repair (Amst.)*, **46**, 55-60, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.07.003.
 81. Stegelmeier, B. L., Brown, A. W., and Welch, K. D. (2015) Safety concerns of herbal products and traditional Chinese herbal medicines: dehydropyrrolizidine alkaloids and aristolochic acid, *J. Appl. Toxicol.*, **35**, 1433-1437, doi: 10.1002/jat.3192.
 82. Wu, H. C., and Santella, R. (2012) The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma, *Hepat. Mon.*, **12**, 7238, doi: 10.5812/hepatmon.7238.
 83. Chen, C. H., Dickman, K. G., Moriya, M., Zavadil, J., Sidorenko, V. S., Edwards, K. L., Gnatenko, D. V., Wu, L., Turesky, R. J., Wu, X. R., Pu, Y. S., and Grollman, A. P. (2012) Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8241-8246, doi: 10.1073/pnas.1119920109.
 84. Kochenova, O. V., Bezalel-Buch, R., Tran, P., Makarova, A. V., Chabes, A., Burgers, P. M., and Shcherbakova, P. V. (2017) Yeast DNA polymerase ζ maintains consistent activity and mutagenicity across a wide range of physiological dNTP concentrations, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 1200-1218, doi: 10.1093/nar/gkw1149.
 85. Esposito, G., Godindagger, I., Klein, U., Yaspo, M. L., Cumano, A., and Rajewsky, K. (2000) Disruption of the Rev3l-encoded catalytic subunit of polymerase zeta in mice results in early embryonic lethality, *Curr. Biol.*, **10**, 1221-1224, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00726-0.
 86. Wittschleben, J., Shivji, M. K., Lalani, E., Jacobs, M. A., Marini, F., Gearhart, P. J., Rosewell, I., Stamp, G., and Wood, R. D. (2000) Disruption of the developmentally regulated *Rev3l* gene causes embryonic lethality, *Curr. Biol.*, **10**, 1217-1220, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00725-9.
 87. Van Sloun, P. P., Varlet, I., Sonneveld, E., Boei, J. J., Romeijn, R. J., Eeken, J. C., and De Wind, N. (2002) Involvement of mouse Rev3 in tolerance of endogenous and exogenous DNA damage, *Mol. Cell Biol.*, **22**, 2159-2169, doi: 10.1128/mcb.22.7.2159-2169.2002.
 88. Zander, L., and Bemark, M. (2004) Immortalized mouse cell lines that lack a functional Rev3 gene are hypersensitive to UV irradiation and cisplatin treatment, *DNA Repair (Amst.)*, **3**, 743-752, doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.031.
 89. Wittschleben, J. P., Reshmi, S. C., Gollin, S. M., and Wood, R. D. (2006) Loss of DNA polymerase zeta causes chromosomal instability in mammalian cells, *Cancer Res.*, **66**, 134-142, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2982.
 90. Harfe, B. D., and Robertson, S. (2000) DNA polymerase zeta introduces multiple mutations when bypassing spontaneous DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell*, **6**, 1491-1499, doi: 10.1016/S1097-2765(00)00145-3.
 91. Brondello, J. M., Pillaire, M. J., Rodriguez, C., Gourraud, P. A., Selves, J., Cazaux, C., and Piette, J. (2008) Novel evidences for a tumor suppressor role of Rev3, the catalytic subunit of Pol zeta, *Oncogene*, **27**, 6093-6101, doi: 10.1038/onc.2008.212.
 92. Guo, C., Fischhaber, P. L., Luk-Paszyc, M. J., Masuda, Y., Zhou, J., Kamiya, K., Kisker, C., and Friedberg, E. C. (2003) Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis, *EMBO J.*, **22**, 6621-6630, doi: 10.1093/emboj/cdg626.
 93. Ohashi, E., Hanafusa, T., Kamei, K., Song, I., Tomida, J., Hashimoto, H., Vaziri, C., and Ohmori, H. (2009) Identification of a novel REV1-interacting motif necessary for DNA polymerase kappa function, *Genes Cells*, **14**, 101-111, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01255.x.
 94. Pustovalova, Y., Bezsonova, I., and Korzhnev, D. M. (2012) The C-terminal domain of human Rev1 contains independent binding sites for DNA polymerase η and Rev7 subunit of polymerase ζ , *FEBS Lett.*, **586**, 3051-3056, doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.021.
 95. Pustovalova, Y., Magalhães, M. T., D'Souza, S., Rizzo, A. A., Korza, G., Walker, G. C., and Korzhnev, D. M. (2016) Interaction between the Rev1 C-terminal domain and the PolD3 subunit of Pol ζ suggests a mechanism of polymerase exchange upon Rev1/Pol ζ -dependent translesion synthe-

- sis, *Biochemistry*, **55**, 2043-2053, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01282.
96. Guo, C., Sonoda, E., Tang, T. S., Parker, J. L., Bielen, A. B., Takeda, S., Ulrich, H. D., and Friedberg, E. C. (2006) REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cell*, **23**, 265-271, doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.038.
97. Pustovalova, Y., Maciejewski, M. W., and Korzhnev, D. M. (2013) NMR mapping of PCNA interaction with translesion synthesis DNA polymerase Rev1 mediated by Rev1-BRCT domain, *J. Mol. Biol.*, **425**, 3091-3105, doi: 10.1016/j.jmb.2013.05.029.
98. Masuda, Y., and Kamiya, K. (2002) Biochemical properties of the human REV1 protein, *FEBS Lett.*, **520**, 88-92, doi: 10.1016/s0014-5793(02)02773-4.
99. Choi, J. Y., Lim, S., Kim, E. J., Jo, A., and Guengerich, F. P. (2010) Translesion synthesis across abasic lesions by human B-family and Y-family DNA polymerases α , δ , η , ι , κ , and REV1, *J. Mol. Biol.*, **404**, 34-44, doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.015.
100. Choi, J. Y., and Guengerich, F. P. (2008) Kinetic analysis of translesion synthesis opposite bulky N2- and O6-alkyl-guanine DNA adducts by human DNA polymerase REV1, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23645-23655, doi: 10.1074/jbc.M801686200.
101. Sasatani, M., Xi, Y., Kajimura, J., Kawamura, T., Piao, J., Masuda, Y., Honda, H., Kubo, K., Mikamoto, T., Watanabe, H., Xu, Y., Kawai, H., Shimura, T., Noda, A., Hamasaki, K., Kusunoki, Y., Zaharieva, E. K., and Kamiya, K. (2017) Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level, *Carcinogenesis*, **38**, 570-578, doi: 10.1093/carcin/bgw208.
102. Clark, D. R., Zacharias, W., Panaitescu, L., and McGregor, W. G. (2003) Ribozyme-mediated REV1 inhibition reduces the frequency of UV-induced mutations in the human *HPRT* gene, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4981-4988, doi: 10.1093/nar/gkg725.
103. Mukhopadhyay, S., Clark, D. R., Watson, N. B., Zacharias, W., and McGregor, W. G. (2004) REV1 accumulates in DNA damage-induced nuclear foci in human cells and is implicated in mutagenesis by benzo[a]pyrene-diolepoxide, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5820-5826, doi: 10.1093/nar/gkh903.
104. Dumstorf, C. A., Mukhopadhyay, S., Krishnan, E., Haribabu, B., and McGregor, W. G. (2009) REV1 is implicated in the development of carcinogen-induced lung cancer, *Mol. Cancer Res.*, **7**, 247-254, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0399.
105. Tsaalbi-Shtylik, A., Verspuy, J. W., Jansen, J. G., Rebel, H., Carlee, L. M., van der Valk, M. A., Jonkers, J., de Gruijl, F. R., and de Wind, N. (2009) Error-prone translesion replication of damaged DNA suppresses skin carcinogenesis by controlling inflammatory hyperplasia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21836-21841, doi: 10.1073/pnas.0909507106.
106. Pilzecker, B., and Jacobs, H. (2019) Mutating for good: DNA damage responses during somatic hypermutation, *Front. Immunol.*, **10**, 438, doi: 10.3389/fimmu.2019.00438.
107. Wilson, T. M., Vaisman, A., Martomo, S. A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R., and Gearhart, P. J. (2005) MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase ϵ , suggesting a role for A:T mutations in antibody genes, *J. Exp. Med.*, **201**, 637-645, doi: 10.1084/jem.20042066.
108. Peña-Díaz, J., Bregenhorn, S., Ghodgaonkar, M., Follonier, C., Artola-Borán, M., Castor, D., Lopes, M., Sartori, A. A., and Jiricny, J. (2012) Noncanonical mismatch repair as a source of genomic instability in human cells, *Mol. Cell*, **47**, 669-680, doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.006.
109. Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2007) DNA Polymerase ϵ is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse, *J. Exp. Med.*, **204**, 17-23, doi: 10.1084/jem.20062131.
110. Burns, M. B., Temiz, N. A., and Harris, R. S. (2013) Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers, *Nat. Genet.*, **45**, 977-973, doi: 10.1038/ng.2701.
111. Koito, A., and Ikeda, T. (2013) Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases, *Front. Microbiol.*, **4**, 28, doi: 10.3389/fmicb.2013.00028.
112. Rogozin, I. B., Roche-Lima, A., Lada, A. G., Belinky, F., Sidorenko, I. A., Glazko, G. V., Babenko, V. N., Cooper, D. N., and Pavlov, Y. I. (2019) Nucleotide weight matrices reveal ubiquitous mutational footprints of AID/APOBEC deaminases in human cancer genomes, *Cancers (Basel)*, **11**, 211, doi: 10.3390/cancers11020211.
113. García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M. I., Chocrón, E. S., Mourón, S., Terrados, G., Powell, C., Salido, E., Méndez, J., Holt, I. J., and Blanco, L. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells, *Mol. Cell*, **52**, 541-553, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
114. Bianchi, J., Rudd, S. G., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Soura, V., Taylor, E., Stevanovic, I., Green, A. J., Stracker, T. H., Lindsay, H. D., and Doherty, A. J. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication, *Mol. Cell*, **52**, 566-573, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
115. Mourón, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Chocrón, S., Blanco, L., and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1383-1389, doi: 10.1038/nsmb.2719.
116. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A., Pritchard, C., Blomberg, O. S., Huijbers, I. J., van den Berk, P. C., and Jacobs, H. (2016) PrimPol prevents APOBEC/AID family mediated DNA mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4734-4744, doi: 10.1093/nar/gkw123.
117. Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., and Hirota, K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides, *Cell Cycle*, **15**, 1997-2008, doi: 10.1080/15384101.2016.1191711.
118. Makarova, A. V., Boldinova, E. O., Belousova, E. A., and Lavrik, O. I. (2018) *In vitro* lesion bypass by human PrimPol, *DNA Repair (Amst)*, **70**, 18-24, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.07.009.
119. Piberger, A. L., Walker, A. K., Morris, J. R., Bryant, H. E., and Petermann, E. (2019) PrimPol-dependent single-stranded gap formation mediates homologous recombination at bulky DNA adducts, *bioRxiv*, doi: 10.1101/773242.

TRANSLESION DNA SYNTHESIS AND CARCINOGENESIS*

Review

**E. S. Shilkin¹, E. O. Boldinova¹, A. D. Stolyarenko¹, R. I. Goncharova²,
R. N. Chuprov-Netochin³, R. F. Khairullin⁴, M. P. Smal^{2**}, and A. V. Makarova^{1**}**

¹ *Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences,
123182 Moscow, Russia; E-mail: amakarova-img@yandex.ru*

² *Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
220072 Minsk, Republic of Belarus; E-mail: m.smal@igc.by*

³ *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

⁴ *Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, 420012 Kazan, Russia*

Received December 4, 2019

Revised February 20, 2020

Accepted February 20, 2020

Tens of thousands of DNA lesions are formed in mammalian cells each day. DNA translesion synthesis (TLS) is the main mechanism of tolerance to unrepaired DNA lesions in cells. DNA polymerases iota (Pol ι), eta (Pol η), kappa (Pol κ) and zeta (Pol ζ) possess an active site that is undemanding to the structure of DNA template and effectively incorporate nucleotides opposite DNA lesions. However, they have low accuracy of DNA synthesis and are a source of mutations in genomic DNA. Loss of these polymerases can lead to an increased risk of cancer.

Keywords: DNA translesion synthesis, DNA damage, mutagenesis, carcinogenesis

УДК 577.032

ОБЗОР МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНА Tgfβ3 КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АГЕНТА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Обзор

© 2020 М.С. Божокин^{1,2*}, Ю.В. Сопова^{3,4,5}, Д.В. Качкин^{4,5}, А.А. Рубель^{4,5}, М.Г. Хотин²

¹ Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, 195427 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: writeback@mail.ru

² Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики РАН, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет, научная лаборатория биологии амилоидов, 199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 04.01.2020

После доработки 26.02.2020

Принята к публикации 26.02.2020

Гиалиновый хрящ представляет собой аваскулярную соединительную ткань поверхности суставов, состоящую преимущественно из белков внеклеточного матрикса и небольшого количества высоко дифференцированных клеток — хондроцитов. В настоящее время исследуются различные методики восстановления поврежденной суставной поверхности, например, с использованием модифицированной клеточной культуры и биodeградируемого скаффолда. Активно изучаются молекулярные процессы, связанные с пролиферацией хрящевой ткани. Одним из важнейших белков среди цитокинов и факторов роста, влияющих на хондрогенез, является белок Tgfβ3, который выполняет критическую роль для нормальной пролиферации хрящевой ткани. Взаимодействуя с лигандами на поверхности клеточной мембраны, он запускает каскад молекулярных механизмов с участием транскрипционного фактора Sox9. В данном обзоре рассмотрено действие данного цитокина на активацию рецепторного комплекса и последующее внутриклеточное перемещение связанных с этим Smad медиаторов. Также изложен анализ связи данных процессов с увеличением экспрессии основных генов внеклеточного матрикса, таких как *col2a1* и *acan*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Tgfβ3, механизм действия, гиалиновый хрящ, Smad белки, внеклеточный матрикс.

DOI: 10.31857/S0320972520040041

Гиалиновый хрящ — это аваскулярная соединительная ткань поверхности суставов, состоящая преимущественно из белков внеклеточного матрикса и небольшого количества (~ 5% общей массы) высокоспецифичных клеток — хондроцитов [1].

Основными белками внеклеточного матрикса являются коллаген II типа и агрекан. Насыщенность гиалинового хряща водой (2/3 от об-

щей массы) позволяет ему обратимо деформироваться и выдерживать большие механические нагрузки, а гладкая поверхность — осуществлять сгибание сустава с минимальным трением [2]. Однако способность хряща к регенерации весьма ограничена, поэтому повреждения, возникающие на его поверхности, быстро увеличиваются с течением времени и ведут к дальнейшей деградации гиалинового слоя как в диаметре, так и в глубину [3]. В результате дегенеративных процессов, происходящих в нём, суставной хрящ разрушается, что ведёт к нарушению функции сустава, и, как следствие, к необходимости проведения процедуры эндопротезирования. Наиболее часто такой процедуре подвергаются самые нагружаемые суставы: коленный и тазобедренный [4].

Количество оперативных вмешательств в области коленного сустава увеличивается из года в

Принятые сокращения: КИК — клеточно-инженерная конструкция; ММСК — мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки; GDF — факторы роста и дифференцировки; Tgfβ — трансформирующий фактор роста β; Bmp — костный морфогенетический белок; FSH — фолликулостимулирующий гормон; MIF — мюллеровский ингибиторный фактор; SUM — small ubiquitin-like modifier; SARA — smad anchor for receptor activation; SBE — smad-binding element; Sp1 — special protein.

* Адресат для корреспонденции.

год из-за разных факторов (травмы, заболевания, спортивные нагрузки и т.д.). В 2007 г. Kurtz спрогнозировал, что из-за целого ряда факторов (травмы, спортивные нагрузки, ожирение, различные заболевания, генетические предрасположенности и др.) с 2007 по 2030 гг. количество эндопротезирований только коленного сустава в США увеличится с 700 тыс. до 3,4 млн в год [5]. Несмотря на то, что современная хирургия располагает большим количеством методик (например, хондропластика и микрофрактурирование [4]), направленных на восстановление повреждённого гиалинового слоя, данная проблема в полном объеме до сих пор не решена.

В 1987 г. Brittberg et al. [6] разработали принципиально новую методику по трансплантации в область дефекта суставного хряща культуры аутологичных хондроцитов, предварительно культивируемой *in vitro* в течение некоторого времени. В настоящее время данную технологию существенно улучшили путем предварительной активации (модификации) клеток [7]. На пролиферацию клеточной культуры влияют различными способами: добавляют факторы роста, изменяют газовый состав смеси при культивации, оказывают механическое воздействие, осуществляют трансфекцию или трансдукцию клеток, направленную на изменение экспрессии ключевых генов, влияющих на хондрогенез. Затем производят совмещение клеточной культуры с биодеградируемым носителем (скаффолдом), и уже получившуюся клеточно-инженерную конструкцию (КИК) трансплантируют в область дефекта гиалинового хряща.

Для создания и успешного применения таких конструкций важно детальное понимание молекулярных механизмов, ответственных за регуляцию регенерации хрящевой ткани, чтобы получившаяся КИК была устойчивой к механическим нагрузкам. Главной задачей для получения положительного эффекта от применения КИК в среднесрочной перспективе является пролиферация клеточной культуры с формированием гиалиноподобного регенерата в области дефекта и отсутствие деградации трансплантированного объекта. В настоящее время уделяется большое внимание анализу влияния действия различных факторов на клеточную культуру в составе КИК, в том числе, цитокину Tgf β 3, играющему одну из ключевых ролей в пролиферации клеток при хондрогенезе [8, 9].

Данный обзор посвящён механизмам действия Tgf β 3 на увеличение экспрессии генов основных белков внеклеточного матрикса (коллагена II типа и агрекана) и, как следствие, возможности его применения в ближайшем будущем в качестве терапевтического агента.

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ ПОВЕРХНОСТИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Существует целый ряд причин возникновения дефектов в коленных и тазобедренных суставах: травмы, различные заболевания, избыточный вес, чрезмерные нагрузки или генетическая предрасположенность [10]. Исследование проблемы восстановления повреждённой поверхности сустава началось ещё в XVIII в. В 1743 г. Вильям Хантер впервые отметил, что однажды повреждённый хрящ уже никогда не восстанавливался, а в 1853 г. Джеймс Рагет написал: «Неизвестно ни единого случая, когда потерянная часть хряща восстанавливалась новым, хорошо сформированным хрящом» [1]. В середине XX в. исследователи предположили гипотезу, что из-за аваскулярной природы хряща для его регенерации нужен доступ питательных веществ и клеточных элементов в зону дефекта. Так, в 1960-х гг. появилась технология субхондральной туннелизации и её модернизированная версия — микрофрактурирование [11]. Суть метода состояла в том, что в зоне дефекта гиалинового хряща создавались множественные отверстия («туннели») в подлежащую субхондральную кость, через которые мигрировали клетки костного мозга. Технология позволяла получить положительный результат, но лишь в краткосрочной перспективе, и с течением времени образовавшийся на месте первоначального повреждения регенерат вновь деградировал. Несмотря на существенные недостатки, данная технология до сих пор применяется в клинической практике во многих странах мира [1].

В 1994 г. группа шведских исследователей во главе с Brittberg M. предложила принципиально новую методику [6]. Суть данного метода заключалась в том, что у пациента предварительно осуществляли забор аутологичных хондроцитов, далее проводили их культивирование *in vitro*, и затем осуществляли трансплантацию культуры клеток в область дефекта. Технологию называли ACI (autologous chondrocyte implantation). Позже вместо культуры хондроцитов было предложено использовать культуру мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs — induced pluripotent stem cells), а также клеток из других источников [12] в сочетании с биодеградируемым носителем. Так началась эпоха применения клеточно-инженерных конструкций для замещения дефектов гиалинового хряща. Применение такой

комбинации позволяло зафиксировать трансплантируемую культуру клеток внутри области дефекта, и, тем самым, существенно уменьшить миграцию клеток из зоны повреждения на начальном этапе, а применение биodeградируемого полимера защищало клетки от значительных механических нагрузок непосредственно после трансплантации. Уже в среднесрочной перспективе были получены положительные результаты, однако вскоре стало понятно, что на больших сроках регенерат снова подвергался деградации [7]. Был сделан вывод, что, скорее всего, используемая клеточная культура (хондроцитов, ММСК или других клеток) не позволяла за короткое время создать регенерат, способный выполнять функции неповрежденного гиалинового хряща в полной мере [1].

Тогда возникло предложение предварительно искусственно модифицировать используемую культуру клеток с целью придания или усиления тех свойств, которые у неё первоначально отсутствовали для достижения лучшего терапевтического эффекта [1].

Потенциал для модификации клеточной культуры в настоящее время огромен. Однако принципиальных групп методов модификации клеточной культуры всего три:

1) физическое (механическое) воздействие — осуществляется с помощью электромагнитного излучения, механического давления, изменения газовой среды и т.д. [13–16]. Данная процедура относительно проста в исполнении и экономически доступна, однако недостаточно эффективна. Её возможности по модификации клеточной культуры ограничены;

2) химическое воздействие представляет собой добавление к культуре клеток различных агентов: химических соединений, цитокинов, гормонов, факторов роста, рекомбинантных белков и т.д. [17, 18];

3) генетическое воздействие состоит в изменении генетического материала отдельных клеток или всей популяции [19, 20]. Следствием этого является изменение уровня экспрессии отдельных генов и/или увеличение (или прекращение) синтеза различных белков. Такие изменения генотипа клеток являются методически непростой задачей, так как эволюционно природа создала множество барьеров для проникновения чужеродной генетической информации в клетки.

Для генетической модификации культуры клеток и восстановления поврежденной суставной поверхности исследователи обратили свой взгляд на белки, участвующие в регуляции хондрогенеза и образовании гиалинового хряща. Одним из таких белков является цитокин Tgfβ3,

имеющий ключевое значение при хондрогенной пролиферации суставного хряща [21].

Цитокин Tgfβ3 играет важнейшую роль в формировании гиалинового хряща, пролиферации, регуляции синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса, таких, как коллаген II типа и агрекан, а также способствует ингибированию ферментов, ответственных за деградацию матрикса, например, коллагеназы 3, кодируемой геном *MMP13* [22].

История изучения белка Tgfβ3 насчитывает более 40 лет, и в настоящее время данному белку посвящено порядка 70 тыс. статей, согласно базе PubMed [23]. Многие белки, принимающие участие в регуляции пролиферации клеток, изначально были названы «факторами роста», так как именно изменение пролиферации клеточной культуры было проще всего анализировать [24]. Именно на это обратили внимание в 1978 г. итальянские учёные Todaro и de Larko, которые обнаружили, что клетки вирусно-трансформированной мышечной саркомы 3T3 продуцировали специальный «фактор», под влиянием которого неопухолевые клетки почки крысы (NRK) приобретали неопластический фенотип [25]. Данный фактор назвали «sarcoma growth factor» (SGF) и связали его активность со способностью клеток расти на мягком агаре [26]. Было показано, что SGF на самом деле состоит из двух белков. Первый белок получил название «трансформирующий ростовой фактор-альфа» (transforming growth factor-α, TGF-α). Этот белок стимулировал рост только маленьких колоний неопластических крысиных фибробластов. Вторым белком, стимулировавшим рост большего количества крупных колоний, назвали «трансформирующий ростовой фактор-бета» (transforming growth factor β) [27]. Впервые этот белок был выделен и подробно описан в 1983 г. американскими учёными во главе с R. Assoian [28]. Группа похожих по строению белков рассмотрена далее в данном обзоре.

В настоящее время у человека открыто 33 белка, сходных по строению своей димерной структуры и входящих в т.н. «суперсемейство трансформирующего ростового фактора β» [24]. Белки данной группы выполняют важнейшую роль в клеточной дифференцировке, миграции и адгезии [21]. Нарушения в синтезе и механизме регуляции активности белков этого семейства приводят к большому количеству заболеваний человека, включая тканевые фиброзы [29] и онкологические заболевания [30–32].

«Суперсемейство Tgfβ» у человека имеет сложную иерархию, однако, несмотря на разнообразие данных белков, все члены и подгруппы этого семейства имеют сходную димерную

структуру, похожую на «крылья бабочки». Большинство членов семейства дополнительно стабилизируются дисульфидными связями между цепями, которые связывают момеры вместе собой [33, 34].

«Суперсемейство Tgf β » можно принципиально разделить на пять подгрупп:

1) изоформы белков непосредственно подсемейства Tgf β (Tgf β 1, Tgf β 2, Tgf β 3). Tgf β 1 имеет фундаментальное значение для развития, физиологии и патологии сосудистой системы [35]. Tgf β 2 связывают с развитием дегенеративных процессов органов зрения [36, 37]. Tgf β 3 принимает участие в процессах, связанных с формированием структур дермы (или эпидермиса), а также пролиферацией и образованием гиалинового хряща [37–39];

2) костные морфометрические белки BMP (bone morphometric proteins) — участвуют в формировании и пролиферации костной ткани, стимулируют экспрессию гена *Runx2* [40], кодирующего белок runt-related transcription factor2, также известный под названием CBF-alpha-1 (core-binding factor subunit alpha-1), являющийся ключевым транскрипционным фактором для остеобластической дифференцировки пролиферации клеток;

3) факторы роста и дифференцировки GDF имеют гомологию с костными морфометрическими белками, поэтому в некоторых классификациях данные две группы объединены. Белки GDF играют ключевую роль при дифференцировке во время эмбриогенеза, а также при пролиферации клеток в сформированных тканях, таких как селезенка, тимус, яичник и другие [33];

4) активины/ингибины. Данные белки первоначально описаны в работе D. Yu et al. в качестве регуляторов фолликул стимулирующего гормона (FSH) [41]. Название эти белки получили в 1987 г., когда N. Ling et al. обнаружили свойство активинов стимулировать высвобождение FSH из гипофиза, в отличие от ингибина, который мог избирательно блокировать синтез и секрецию гормона FSH [42, 43].

В настоящее время известно, что данные представители суперсемейства Tgf β принимают участие во многих процессах, начиная от ранних стадий эмбрионального развития и стимулирования секреции гормонов у позвоночных и заканчивая специализированными функциями в дифференцированных тканях и клетках [44];

5) остальные белки: в эту группу входят белки Lefty, Nodal, мюллеровский ингибиторный фактор (MIF) и другие белки [45]. Они демонстрируют слабое сходство с димерной структурой остальных членов суперсемейства Tgf β , од-

нако, похожи по строению мономерных частей [33, 34].

Их функции разнообразны. Например, MIF является важным регулятором дифференцировки репродуктивных органов в процессе эмбрионального развития [46]. Lefty играет важную роль в ингибировании различных сигнальных путей, влияющих на направление дифференцировки [47]. Nodal — белок, играющий одну из ключевых ролей в раннем эмбриональном развитии и формировании мезодермы у позвоночных [48]. Номенклатура названий белков суперсемейства Tgf β довольно сложна, и многие из них исторически получили несколько названий, которые не всегда верно отражают их функции [49].

Несмотря на всё многообразие функций, которые выполняют белки суперсемейства Tgf β , наиболее заметное влияние они оказывают на клеточную дифференцировку в целом, и синтез внеклеточного матрикса, в частности [49].

В связи со значительной ролью, которую играет непосредственно белок Tgf β 3 в пролиферации и хондрогенной дифференцировке, в данной работе мы подробно рассмотрим цепочку молекулярных процессов, начиная от взаимодействия белка с рецепторами на поверхности клеточной мембраны и заканчивая увеличением экспрессии генов внеклеточного матрикса.

Изоформы белка Tgf β представляют собой небольшие секретируемые во внеклеточное пространство гомодимерные сигнальные белки [45], у млекопитающих выявлено только три из них: Tgf β 1, Tgf β 2 и Tgf β 3. Белки семейства Tgf β являются высоко консервативными, степень идентичности между данными изоформами у человека и некоторых млекопитающих может достигать почти 100%, поэтому в экспериментальных работах на животных часто используют белок человеческого происхождения.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА Tgf β 3

Клеточный сигналинг, опосредованный белками подсемейства изоформ Tgf β , начинается с взаимодействия белка Tgf β с его рецепторами T β R, находящимися на плазматической мембране. Три изоформы Tgf β 1, Tgf β 2 и Tgf β 3 связываются с рецепторами T β RI, T β RII и T β RIII. При этом один и тот же белок может присоединяться ко всем вышеуказанным рецепторам, но с различной аффинностью [24, 50]. На поверхности большинства клеток организма находятся рецепторы T β RI и T β RII, количество которых варьируется от 5 до 10 тыс. на клетку, количество рецепторов T β RIII может составлять до 200 тыс. на одну клетку [24, 51]. Рецепторы являют-

ся двух специфическими киназами (способны фосфорилировать как серин и треонин, так и тирозин [52], передающими сигнал из внеклеточного пространства к внутриклеточным медиаторам — Smad белкам, которые постоянно циркулируют между цитоплазмой и ядром. Рецептор TβRII фосфорилирует TβRI, что инициирует Smad-опосредованный сигналинг [21, 53]. В ядре Smad белки выполняют роль транскрипционных факторов и взаимодействуют с определёнными последовательностями ДНК в промоторной области, таким образом регулируя экспрессию различных генов. Белок Tgfβ3 может активировать не только сигнальный путь Smad (канонический путь — canonical pathway), но и другие сигнальные пути (неканонический путь), например, путь митоген-активируемой протеинкиназы MAPK (ERK, JNK и p38), сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), протеинкиназы B (AKT) и протеинкиназы (mTOR — мишень рапамицина у млекопитающих) — (PI3K/AKT/mTOR). Эти пути напрямую не связаны с увеличением синтеза внеклеточного матрикса, и поэтому в данной работе подробно рассмотрены не будут.

РЕЦЕПТОРЫ

На поверхности клетки могут находиться три вида рецепторов: TβRI, TβRII и TβRIII.

К TβRI относятся активин-рецепторные киназы 1–7 (ALK1–7). При этом в сигналинге, опосредованном Tgfβ, принимает участие киназа ALK5.

К TβRII относятся непосредственно TβRII (TGF-β type II или TβRII, который является серин-треониновой киназой), рецептор для костного морфометрического белка 2 (BMPRII), активинный рецептор II (ACTRII, ACTRIIB), а также рецептор антимюллерового гормона II (AMHRII).

К TβRIII относятся белки бетагликан и эндоглин, которые по большей части действуют в виде корецепторов для увеличения эффективности передачи сигнала Tgfβ [50].

На поверхности клетки рецепторы существуют в виде мономеров, димеров и гетеромеров, что позволяет транслировать сигнал в клетку только в случае образования упорядоченного рецепторного комплекса при его взаимодействии с лигандом [24].

При присоединении лиганда к соответствующему рецептору происходит образование тетрамерного гетерокомплекса, состоящего из двух рецепторов I типа и двух рецепторов II типа [54–59].

Несмотря на то, что большинство исследователей считает, что для передачи сигналов необходимо образование именно тетрамерного комплекса, в одной работе Huang et al. показали, что также и димер, состоящий из рецепторов TβRI и TβRII, способен эффективно передать во внутриклеточное пространство соответствующий сигнал [60]. После образования тетрамерного гетерокомплекса происходит трансфосфорилирование TβRI под действием TβRII и запускается дальнейшая цепочка передачи сигналов во внутриклеточное пространство.

Активность рецепторов также может регулироваться другими посттрансляционными модификациями, например, убиквитинированием [61–64]. Так как оба рецептора являются полиубиквитинированными, то при удалении убиквитина с рецептора TβRI происходит стабилизация рецепторного комплекса и увеличивается эффективность передачи сигнала [65]. Таким образом, ингибирование убиквитинлигазы приводит к дополнительной активации всего комплекса передачи сигналов. Аналогично убиквитинированию на рецепторы влияет и сумоилирование (присоединение белка SUMO) (small ubiquitin-like modifier), приводя к их стабилизации и повышению эффективности передачи сигналов. Сумоилирование также регулирует клеточную локализацию рецепторов [66], влияя, таким образом, на их совместную активацию. Другим механизмом активации является действие шаперона Hsp90, который стабилизирует оба рецептора на поверхности клеточной мембраны и блокирует их взаимодействие с E3 протеин-убиквитиновой лигазой (убиквитинлигазой), кодируемой геном *Smurf2*. Данная лигаза взаимодействует с белком Smad7, образует стабильный комплекс с фосфорилированными белками Smad2 и Smad3 и инактивирует их.

Для рецепторного комплекса TβRI/TβRII было исследовано большое количество белков, которые либо ингибируют передачу сигналов (BAMBI, STRAP, Tollip, SIK, FKBP12) [21], либо, наоборот, её усиливают (TSC-22). Протеолитическое расщепление рецепторов под действием белков TACE или ADAM17 ингибирует дальнейший механизм передачи сигналов с помощью Tgfβ [67].

Smad БЕЛКИ

Белок Tgfβ3 регулирует экспрессию генов путем взаимодействия с рецепторами TβRI/TβRII, что индуцирует опосредованную активацию внутриклеточных Smad белков. Эти белки, которые были первоначально открыты у

дрозофилы, своё название получили от сокращения от *Caenorhabditis elegans* SMAl («маленький» червь) и от *Drosophila* MAD («mothers against decapentaplegic»). Smad белки передают сигнал с внутренней части клеточной мембраны в ядро для активации экспрессии различных генов (в том числе генов внеклеточного матрикса). Семейство Smad белков является важнейшим медиатором регуляции сигналинга Tgf β 3, на сегодняшний день описано большое количество механизмов регулирования действия данных белков [68].

Известно три разновидности белков Smad, включающих 8 членов данного семейства, которые можно разделить на три принципиальные подгруппы:

1) рецептор-регулируемые R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad9 (иногда в литературе встречается обозначение Smad8 или Smad8/9 — так как у белка, кодируемого геном *Smad9*, есть две изоформы — Smad8 и Smad8b [69]);

2) партнеры Co-Smad (в литературе встречаются обозначения Co-Smad или CSmad, или Smad4 (Smad4 «COmmon partner»));

3) ингибиторы I-Smad (Smad6, Smad7).

Представители Smad белков — Smad1, Smad5 и Smad8/9, — относящиеся к группе R-Smad, а также представитель I-Smad — белок Smad6, участвуют в передаче сигналов, опосредованных белками BMPs и GDF [40, 70] но не белками Tgf β 1-3. Действие белков Smad 1,5,8/9 важно, так как они регулируют процессы, связанные с остеогенезом. R-Smad могут активировать и/или блокировать транскрипцию фактора Runx2 — главного регулятора развития костной ткани. Хондрогенная и остеогенная дифференцировка являются взаимно исключающими одновременными процессами по отношению к одной клетке. Поэтому активация одного пути неминуемо ведет к ингибированию другого. Например, было показано, что белки Smad2 и Smad3 ингибируют экспрессию гена *Runx2* [71]. Smad3, проникая в ядро в составе комплекса Smad2/3 + Smad4, рекрутирует гистон-деацетилазу II (HDAC), которая действует как ко-репрессор в Smad3-опосредованной транскрипционной репрессии фактора Runx2, что подтверждает негативное влияние воздействия Tgf β на остеогенез [71, 72].

Белки R-Smad содержат два домена MH1 и MH2, соединенные линкерной последовательностью. Домен MH1 имеет шпильчатую структуру, содержит сигнал ядерной локализации и ответственен за связывание с ДНК и мРНК, различными ДНК-связывающими ко-факторами, ко-активаторами и ко-репрессорами [73]. До-

мен MH2 содержит петлю L3, способствующую взаимодействию R-Smads с внутриклеточной частью рецептора T β RI. При образовании гетеротетраммерного комплекса из двух рецепторов T β RI и двух T β RII белок T β RI фосфорилирует два остатка серина на C-конце R-Smad в мотиве SSXS (Ser-Ser-X-Ser) [21]. В результате данного действия два белка R-Smad отсоединяются от внутриклеточной части гетерорецепторного комплекса, называемой «SARA» (smad anchor for receptor activation), после чего два белка R-Smad (Smad2 + Smad3) и один co-Smad (Smad4) в составе одного комплекса направляются к ядру. Они транспортируются в ядро через ядерные поры и с помощью MH1 домена связываются с ДНК [73]. В ядре домен MH2 взаимодействует с различными ядерными факторами и контролирует транскрипцию большого количества генов. Ингибирование данного сигнального пути происходит за счет различных действий Smad7: взаимодействия с R-Smad, дефосфорилирования гетерорецепторного комплекса, индукции деградации активированного рецепторного комплекса, взаимодействия с убиквитинлигазой, а также препятствования присоединения к ДНК комплекса R-Smads и co-Smad. При этом ингибирование сигналинга Tgf β 3 белком Smad7 не является однозначным процессом. В общем виде Smad7 выполняет непростую роль, обеспечивая отрицательную обратную связь Tgf β 3 сигналинга и поддерживая его в определённых границах [50, 54, 74, 75].

В дополнение к трем основным событиям, которые приводят к активации белков Smad (фосфорилирование SSXS мотива белками R-Smads, отщепление комплекса двух R-Smad и одного co-Smad от тетраммерного рецепторного комплекса, а также нуклеоплазматического движения Smad белков из цитоплазмы в ядро и обратно), Smad белки являются субъектами разного рода посттрансляционных модификаций, таких как убиквитирование, сумоилирование, ацетилирование и АДФ рибозилирование, а также фосфорилирование линкерной последовательности, что может влиять на их активность, а также на передачу сигналов Tgf β 3.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ БЕЛКОВ Smad И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСА T β RI/T β RII

Независимо от наличия или отсутствия лигандов, Smad-белки постоянно циркулируют между цитоплазмой и ядром, но комплекс белков Smad2,3/Smad4 обнаруживается только в ядре [70]. Однако было показано, что данный

комплекс белков взаимодействуя с белками Importin7,8 может активно транспортироваться в ядро и накапливаться там, так как эффективность импорта этого комплекса в 4 раза больше эффективности экспорта [76, 77]. В результате рецептор-опосредованного фосфорилирования и ассоциации двух белков R-Smad с одним со-Smad, комплекс из трёх белков проникает в ядро [21, 70]. Нуклеоплазматический транспорт макромолекул в/из ядра происходит через комплекс ядерных пор, пронизывающих ядерную оболочку. В отсутствие активации рецепторов (воздействия белка Tgfβ) Smad7, являющийся репрессором данного сигнального пути, накапливается в ядре, а после активации рецепторов переносится в цитоплазму. Экспорт отдельных белков Smad из ядра может происходить при помощи белков-экспортинов [78]. При попадании в ядро белок Smad 7 блокирует образование комплекса ДНК + Smad (2,3,4) путем связывания домена MH2 белка Smad7 с ДНК [74]. Проведённые исследования подтверждают, что перемещения белков Smad между ядром и цитоплазмой являются активными и направленными процессами, а не пассивной диффузией [78, 79]. По всей видимости, именно концентрация белков Smad в ядре является показателем интенсивности взаимодействия белка Tgfβ3 с клеточными рецепторами [70]. Постоянное перемещение белков семейства Smad между ядром и цитоплазмой позволяет обеспечить контроль внутриклеточных медиаторов для регуляции активности рецепторного комплекса, выполняя, таким образом, роль обратной связи, что является необходимым условием передачи сигнала у всех многоклеточных организмов. Распределение Smad белков внутри клетки и регуляция их перемещения между ядром и цитоплазмой до конца не изучена, но очевидно, что этот процесс вовлечен в активацию или репрессию экспрессии генов [24].

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Smad В ЯДРЕ

При попадании в ядро комплекс белков Smad может связываться с ДНК и регулировать транскрипцию. Активирующая или репрессирующая активность комплекса белков Smad требует обязательной ассоциации его с факторами и кофакторами транскрипции, которые связывают специфические последовательности ДНК в проксимальных промоторных областях или энхансеры с большой аффинностью [24]. Способность регуляции экспрессии генов Smad белками зависит от многих причин: ассоциации с

транскрипционными факторами и ко-регуляторами, таргетного гена, физиологического состояния клетки и строения Smad комплекса [80, 81]. Было показано, что данный комплекс связывается с низкой аффинностью с GC богатой последовательностью «Smad-binding element» (SBE) (например, GTCT или AGAC). Белки R-Smad в активированном комплексе (два R-Smad и один со-Smad) с помощью домена MH2 связываются с транскрипционными факторами для идентификации генов-мишеней и регуляции их экспрессии, что повышает специфичность и аффинность связывания с ДНК [73]. Многие транскрипционные факторы, связывающиеся с комплексом Smad белков, являются тканеспецифичными и, таким образом, играют важную роль в регуляции экспрессии генов.

В работе Qiao et al. [82] было показано увеличение синтеза коллагена II типа — основного белка внеклеточного матрикса гиалинового хряща, в ответ на воздействие белком Tgfβ, однако, данный результат был получен независимо от увеличения экспрессии гена коллагена II типа, а также Smad опосредованного сигналинга. Такие данные свидетельствуют о наличии другого пути активации синтеза коллагена II типа. В работе R. Bhogal et al. [83] был показан альтернативный путь увеличения экспрессии коллагена II, который связан с увеличением экспрессии гена, кодирующего один из рецепторов TβR. В работе этих же авторов на культуре фибробластов *in vitro* было показано, что уровень экспрессии гена коллагена I типа (вида коллагена, не характерного для гиалинового хряща) снижался в результате воздействия на культуру клеток белком Tgfβ [83].

Белок Smad 2/3, проникая в ядро, связывается там с транскрипционными ко-активаторами (например, p300/CBP). Эти белки, в свою очередь, взаимодействуют с транскрипционным фактором Sox9 [40], который является одним из ключевых транскрипционных факторов при активации хондрогенеза. Таким образом, белки Smad2 и Smad3 активируют экспрессию и синтез коллагена II типа [84]. Взаимодействие Smad с активатором p300/CBP-associated factor (PCAF) критически необходимо для формирования хряща [85]. Взаимодействие данных белков с факторами транскрипции FoxO (forkhead transcription factors (FoxO1,3,4)) приводит к пролиферации и росту хрящевой ткани, что было показано на экспериментах на рыбах *Danio rerio* [86]. Кроме того, взаимодействие между путями регуляции, включающими Smad белки и транскрипционные факторы FoxO, обеспечивает интеграцию сигнальных путей, активируемых Tgfβ и PI3K/АКТ/mTOR [87, 88]. Такое перекрёстное взаимодействие может быть также достиг-

нуто за счет совместного использования генов-мишеней Smad [89, 90].

Ранее была показана возможность взаимодействия белков Smad2 и Smad3, которые являются медиаторами Tgf β сигналинга, с транскрипционным фактором Sp1 — Special protein1 [50, 91]. Одновременно было показано, что увеличение экспрессии гена *Sp1* влияет на увеличение экспрессии гена *Sox9*, и, соответственно, увеличивает синтез коллагена II типа [92]. Аналогичные данные были получены и для транскрипционных факторов c-Jun/c-Fos (другое название, встречающееся в литературе — Ap1) и Sertadt1 [50].

При активации рецептора T β RI происходит увеличение продукции агрекана [93] — другого важнейшего белка внеклеточного матрикса. При активации регуляции по пути Smad 1,5,8 увеличивается синтез металлопротеиназы 13 (MMP-13) [93], ответственной за деградацию внеклеточного матрикса, что, по-видимому, обусловлено связью белков Smad1,5,8 с Runx2 — ключевым транскрипционным фактором при остеогенезе.

Общая схема регулирования экспрессии гена коллагена II типа (*col2a1*) через Smad медиаторы и Tgf β передачу сигналов представлена на рисунке.

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МАТРИКСА С ПОМОЩЬЮ микро РНК

Другим механизмом передачи сигналов под действием белка Tgf β 3, влияющим на регуляцию экспрессии генов внеклеточного матрикса гиалинового хряща, является взаимодействие с микроРНК. Данные молекулы являются небольшими (18–25, в среднем, 22 нуклеотида) некодирующими последовательностями РНК. Они комплементарны определённому фрагменту мРНК (у животных это обычно 3' некодирующая область), и их взаимодействие с мРНК вызывает ингибирование трансляции [94, 95]. Биосинтез микроРНК начинается с транскрипции генов микроРНК с помощью РНК полимеразы II и синтеза длинных фрагментов, известных как пре-микроРНК. В результате ядерного процессинга у позвоночных пре-микроРНК идентифицируется белком Di (george syndrome critical region8) (DGCR8), который при взаимодействии с комплексом Drosha разрезает пре-микроРНК. Получившиеся фрагменты экспортируются из ядра белком Exportin-5 и в результате цитоплазматического процессинга данные фрагменты разрезаются рибонуклеазой Dicer [96]. Связывание Tgf β с рецепторами модулирует экспрессию микроРНК

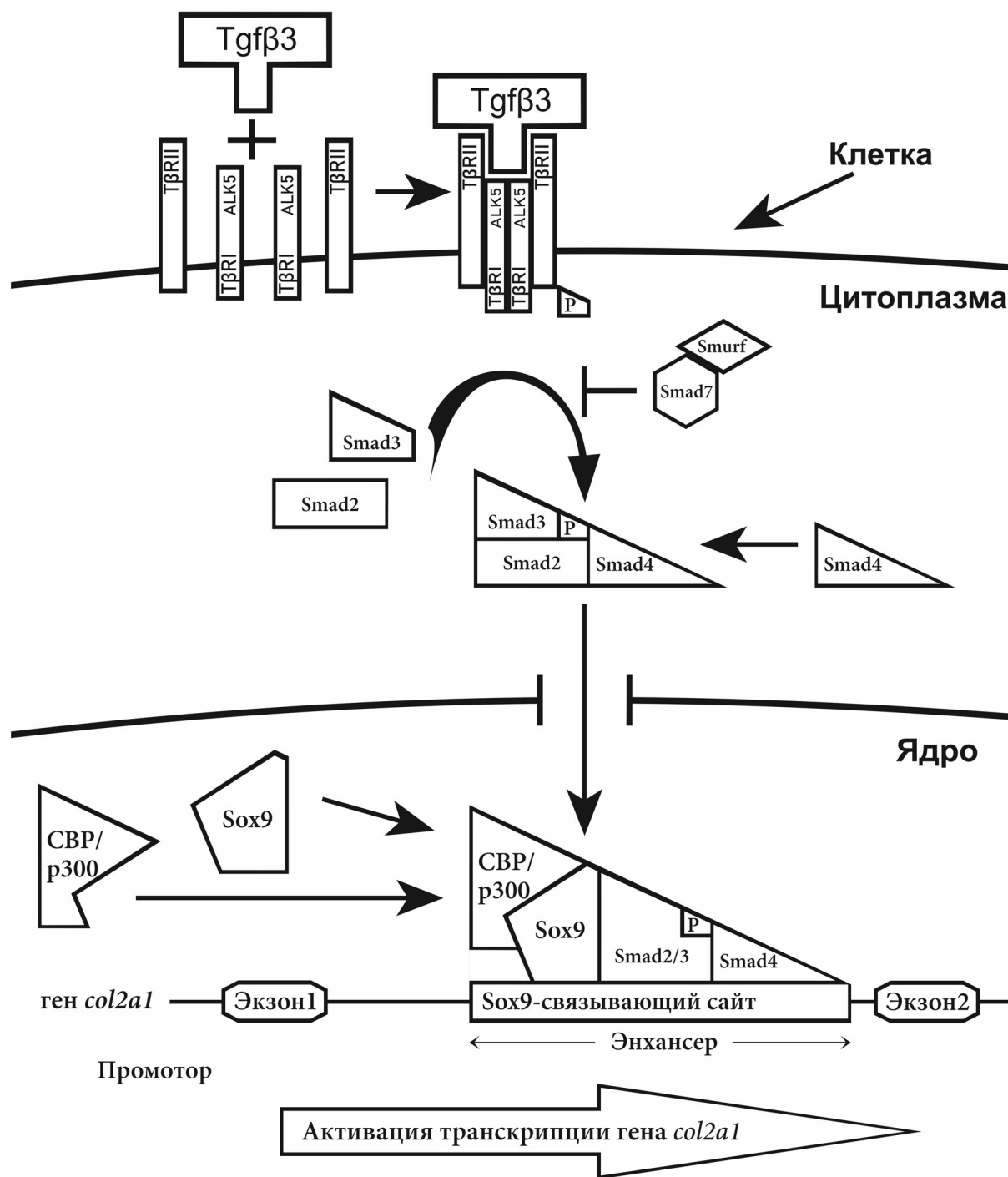
как транскрипционно — через ДНК-связывающую активность комплексов Smad, так и посттранскрипционно — через РНК-связывающую активность R-Smad [21].

На сегодняшний момент открыто и описано большое количество микроРНК, влияющих на регуляцию Tgf β сигналинга [21]. Некоторые из них принимают участие в процессах, связанных с хондрогенезом. Например, микроРНК410 взаимодействует с регуляторным путём Wnt, который перекрёстно связан с механизмом передачи сигналов, инициируемым Tgf β белком [97]. Было показано, что микроРНК присоединяется к 3'-нетранслируемой области гена *wnt3a*, который регулирует сигнальный путь Wnt. Культура клеток, у которых искусственно активирована микроРНК410, увеличивает синтез основных белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща, таких как коллаген II типа, агрекан, а также синтез транскрипционного фактора Sox9, важного при хондрогенезе [97]. МикроРНК495 является важным регулятором хондрогенной дифференцировки [98], так как в 3'-нетранслируемой области гена *sox9* есть область связывания с данной микроРНК. Сверхэкспрессиями РНК495 репрессирует экспрессию генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса (коллаген II типа и агрекан), а ингибирование ее экспрессии приводит к обратному эффекту.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Tgf β 3 ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Использование различных белков, стимулирующих процессы регенерации хряща и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, как по отдельности, так и в комбинации между собой, в настоящее время является перспективным направлением в терапии целого ряда заболеваний опорно-двигательного аппарата, что было показано, в том числе, и в наших пилотных экспериментах [17]. Белок Tgf β 3 активно используется для восстановления гиалинового слоя, при этом он не только стимулирует хондрогенез [99–101, 100], но и подавляет активность медиаторов воспаления и матриксных металлопротеиназ, таких как IL-1, MMPs и TNF- α [101, 102]. Трансплантация биodeградируемых носителей (на основе фиброина или внеклеточного матрикса хондроцитов), содержащих Tgf β 3, приводила к регенерации повреждений хряща *in vivo*, при этом комбинация Tgf β 3 с механозависимым фактором роста MGF давала синергический эффект [103–105].

Следующим шагом на пути разработки трансплантатов, способных эффективно замещать


 Активация транскрипции гена *col2a1* под действием белка Tgfβ

дефекты хряща, стало использование матрикса, содержащего не только белок Tgfβ3, но и различные варианты стволовых или частично дифференцированных клеток. Так, Wang et al. успешно использовали деминерализованную костную ткань в сочетании с мезенхимальными стволовыми клетками, продуцирующими Tgfβ3

и Bmp2 [106], а в работе Sun et al. была показана эффективность инъекций стволовых клеток жировой ткани в комплексе с Tgfβ3 [107]. В настоящее время активно ведется разработка 3D-моделей скаффолда, способных обеспечить равномерное распределение стволовых клеток по всему объему матрикса и пролонгированное высво-

бождение активаторов хондрогенеза [108]. Удачным примером таких моделей является сочетание клеток стромальной васкулярной фракции с гидрогелем метакрилат-желатина, содержащим Tgf β 3, использованное для терапии поврежденного мениска [109].

Почти три десятилетия прошли с открытия рецепторов и сигнальных медиаторов белка Tgf β 3. В настоящее время механизм воздействия данных белков на рецепторы клеточной поверхности и активацию внутриклеточного сигналинга посредством белков семейства Smad, в целом, понятен. Взаимодействие Smad белков с транскрипционными факторами влияет на увеличение экспрессии генов коллагена II типа и агрекана, что приводит к увеличению синтеза внеклеточного матрикса гиалинового хряща. После открытия этого явления исследователи задумались об использовании белка Tgf β 3 в терапевтических целях для восстановления гиалинового слоя хрящевой поверхности. Появились работы по модификации клеточной культуры ММСК рекомбинантным белком Tgf β 3 для последующей дифференцировки и хондрогенной пролиферации как в экспериментах *in vitro* [105]. Следующим этапом стало применение в экспериментах на животных клеточно-инженерных конструкций с модифицированными ММСК для восстановления поврежденного слоя гиали-

нового хряща, что было показано Sun et al. [107], а также в наших собственных работах [17]. Применение данного цитокина для модификации клеточной культуры (как с помощью рекомбинантных белков, так и с помощью созданных плазмид, несущих ген данного белка), на наш взгляд, является перспективным направлением при создании КИК для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща. Однако такие работы требуют от исследователей детального понимания всех молекулярных механизмов и дозозависимости действия белка Tgf β 3 на культуру клеток и тщательного контроля её пролиферации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы Государственного задания Института цитологии РАН при финансовой поддержке Минобрнауки России и при финансовой поддержке гранта СПбГУ ID 51140332.

Благодарности. Авторы благодарны за сотрудничество ресурсным центрам «ЦКП ХРОМАС», «Биобанк» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.

Конфликт интересов. Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетылько Г. И. (2016) Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща (аналитический обзор литературы), *Травматология и ортопедия России*, **22**, 122-134, doi: 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134.
2. Sophia Fox, A. J., Bedi, A., and Rodeo, S. A. (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function, *Sports Health*, **1**, 461-468, doi: 10.1177/1941738109350438.
3. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетылько Г. И., Румакин В. П., Наконечный Д. Г., Чепурненко М. Н. (2017) Морфофункциональная характеристика хондрорегенераторного процесса в экспериментальном локальном дефекте поверхности суставного хряща, *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, **8**, 302-306.
4. Maglio, M., Brogini, S., Pagani, S., Giavaresi, G., and Tschon, M. (2019) Current trends in the evaluation of osteochondral lesion treatments: histology, histomorphometry, and biomechanics in preclinical models, *Bio. Med. Research Intern.*, **2019**, 4040236, doi: 10.1155/2019/4040236.
5. Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., and Halpern, M. (2007) Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030, *J. Bone Jt. Surg. — Ser. A.*, **89**, 780-785, doi: 10.2106/JBJS.F.00222.
6. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **6**, 889-895, doi: 10.1056/NEJM199410063311401.
7. Xiang, Y., Bunpetch, V., Zhou, W., and Ouyang, H. (2019) Optimization strategies for ACL: a step-chronicle review, *J. Orthopaedic Transl.*, **17**, 3-14, doi: 10.1016/j.jot.2018.12.005.
8. Elmallah, R., Cherian, J., Jauregui, J., Pierce, T., Beaver, W., and Mont, M. (2015) Genetically modified chondrocytes expressing TGF- β 1: a revolutionary treatment for articular cartilage damage? *Expert Opin. Biol. Therapy*, **15**, 455-464, doi: 10.1517/14712598.2015.1009886.
9. Finnson, K., Chi, Y., Bou-Gharios, G., Leask, A., and Philip, A. (2012) TGF-beta signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis, *Front. Biosci. Sch.*, **1**, 251-268, doi: 10.2741/s266.
10. Jeuken, R., Roth, A., Peters, R., Van Donkelaar, C., Thies, J., Van Rhijn, L., and Emans, P. J. (2016) Polymers in cartilage defect repair of the knee: current status and future prospects, *Polymers*, **4**, 8, doi: 10.3390/polym8060219.
11. Plánka, L., Starý, D., Srnec, R., Necas, A., and Gál, P. (2008) New options for management of posttraumatic articular cartilage defects, *Rozhledy v Chirurgii: Měsíčník Československé Chirurgické Společnosti*, **87**, 1, 42-45.
12. Diederichs, S., Gabler, J., Autenrieth, J., Kynast, K., Merle, C., Walles, H., Utikal, J., and Richter, W. (2016)

- Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation, *Stem Cells Dev.*, **25**, 598-609, doi: 10.1089/scd.2015.0312.
13. Skuse, G., and Lamkin-Kennard, K. (2013) Reverse engineering life: physical and chemical mimetics for controlled stem cell differentiation into cardiomyocytes, *Methods Mol. Biol.*, **1001**, 99-114, doi: 10.1007/978-1-62703-363-3_9.
 14. Tokuda, S., and Yu, A. (2019) Regulation of epithelial cell functions by the osmolality and hydrostatic pressure gradients: a possible role of the tight junction as a sensor, *Intern. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20143513.
 15. Vieira, H., Alves, P., and Vercelli, A. (2011) Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species, *Prog. Neurobiol.*, **93**, 444-455, doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.007.
 16. Khamo, J., Krishnamurthy, V., Sharum, S., Mondal, P., and Zhang, K. (2017) Applications of optobiology in intact cells and multicellular organisms, *J. Mol. Biol.*, **429**, 2999-3017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.08.015.
 17. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетылько Г. И., Наконечный Д. Г., Блинова М. И., Нашекина Ю. А. (2018) Результаты замещения поверхностного дефекта гиалинового хряща крысы клеточно-инженерной конструкцией в эксперименте, *Труды Карельского НЦ РАН*, **4**, 13-22, doi: 10.17076/them815.
 18. Kuroda, Y., Kawai, T., Goto, K., and Matsuda, S. (2019) Clinical application of injectable growth factor for bone regeneration: a systematic review, *Inflamm. Regen.*, **39**, 1-10, doi: 10.1186/s41232-019-0109-x.
 19. Hamann, A., Nguyen, A., and Pannier, A. (2019) Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications, *J. Biol. Engin.*, **13**, 7, doi: 10.1186/s13036-019-0140-0.
 20. Oggu, G., Sasikumar, S., Reddy, N., Ella, K., Rao, C., and Bokara, K. (2017) Gene delivery approaches for mesenchymal stem cell therapy: strategies to increase efficiency and specificity, *Stem Cell Rev.*, **13**, 725-740, doi: 10.1007/s12015-017-9760-2.
 21. Hata, A., and Chen, Y. (2016) TGF-β signaling from receptors to smads, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a022061.
 22. Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C., and Deng, C. (2001) TGF-β/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage, *J. Cell Biol.*, **153**, 35-46.
 23. Moses, H., Roberts, A., and Derynck, R. (2016) The discovery and early days of TGF-β: a historical perspective, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a021865.
 24. Derynck, R., and Budi, E. (2019) Specificity, versatility, and control of TGF-β family signaling, *Sci. Signal.*, **12**, 570, doi: 10.1126/scisignal.aav5183.
 25. De Larco, J., and Todaro, G. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4001-4005.
 26. Todaro, G., De Larco, J., and Fryling, C. (1982) Sarcoma growth factor and other transforming peptides produced by human cells: interactions with membrane receptors, *Fed. Proc.*, **41**, 2996-3003.
 27. Kastin, A. (2013) *Handbook of Biologically Active Peptides*, Chapter 225, doi: 10.1016/C2010-0-66490-X.
 28. Assoian, R., Komoriya, A., Meyers, C., Miller, D., and Sporn, M. (1983) Transforming growth factor-β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J. Biol. Chem.*, **258**, 7155-7160.
 29. Frenkel, S., Saadeh, P., Mehrara, B., Chin, G., Steinbrech, D., Brent, B., Gittes, G., and Longaker, M. (2000) Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling, *Plast. Reconstr. Surg.*, **105**, 980-990, doi: 10.1097/00006534-200003000-00022.
 30. Reddi, A., and Cunningham, N. (1990) Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins, *Biomaterials*, **11**, 33-34.
 31. Glick, A., Weinberg, W., Wu, I., Quan, W., and Yuspa, S. (1996) Transforming growth factor beta 1 suppresses genomic instability independent of a G1 arrest, p53, and Rb, *Cancer Res.*, **56**, 3645-3650.
 32. Massagué, J. (1999) Wounding, Smad, *Nat. Cell. Biol.*, **1**, 117-119, doi: 10.1038/12944.
 33. Herpin, A., Lelong, C., and Favrel, P. (2004) Transforming growth factor-β-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans, *Dev. Comp. Immunol.*, **28**, 461-485, doi: 10.1016/j.dci.2003.09.007.
 34. Kwiatkowski, W., Gray, P., and Choe, S. (2014) Engineering TGF-β superfamily ligands for clinical applications, *Trends Pharmacol. Sci.*, **35**, 648-657, doi: 10.1016/j.tips.2014.10.006.
 35. Lu, Y., Boer, J., Barsova, R., Favorova, O., Goel, A., Müller, M., and Feskens, E. (2012) *TGFB1* genetic polymorphisms and coronary heart disease risk: a meta-analysis, *BMC Med. Genet.*, **13**, 39, doi: 10.1186/1471-2350-13-39.
 36. Rao, K., Nagireddy, S., and Chakrabarti, S. (2011) Complex genetic mechanisms in glaucoma: an overview, *Ind. J. Ophthalm.*, **59**, 31-42, doi: 10.4103/0301-4738.73685.
 37. Leuteremann, R., Sheikhzadeh, S., Brockstädt, L., Rybczynski, M., van Rahden, V., Kutsche, K., von Kodolitsch, Y., and Rosenberger, G. (2014) A 1-bp duplication in *TGFB2* in three family members with a syndromic form of thoracic aortic aneurysm, *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**, 944-948, doi: 10.1038/ejhg.2013.252.
 38. Ocleston, N., Laverty, H., O'Kane, S., and Ferguson, M. (2008) Prevention and reduction of scarring in the skin by transforming growth factor beta 3 (TGFβ3): from laboratory discovery to clinical pharmaceutical, *J. Biomater. Sci., Polymer Edition*, **19**, 1047-1063, doi: 10.1163/156856208784909345.
 39. Gilbert, R., Vickaryous, M., and Vilorio-Petit, A. (2016) Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration, *J. Dev. Biol.*, **22**, 4, doi: 10.3390/jdb4020021.
 40. Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y., and Asahara, H. (2005) Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment, *J. Biol. Chem.*, **280**, 8343-8350, doi: 10.1074/jbc.M413913200.
 41. Yu, J., Shao, L., Lemas, V., Yu, A., Vaughan, J., Rivier, J., and Vale, W. (1987) Importance of FSH-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation, *Nature*, **330**, 765-767, doi: 10.1038/330765a0.
 42. Bloise, E., Ciarmela, P., Cruz, C., Luisi, S., Petraglia, F., and Reis, F. (2019) Activin A in mammalian physiology, *Physiol. Rev.*, **99**, 739-780, doi: 10.1152/physrev.00002.2018.
 43. Ling, N., Ying, S., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β-subunits from the two forms of inhibin, *Nature*, **321**, 779-782, doi: 10.1038/321779a0.
 44. Namwanje, M., and Brown, C. (2016) Activins and inhibins: roles in development, physiology, and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a021881.
 45. Chin, D., Boyl, G., Parsons, P., and Coman, W. (2004) What is transforming growth factor-beta (TGF-β)? *Brit. J. Plastic Surg.*, **57**, 215-221, doi: 10.1016/j.bjps.2003.12.012.

46. Kushnir, V., Seifer, D., Barad, D., Sen, A., and Gleicher, N. (2017) Potential therapeutic applications of human anti-Müllerian hormone (AMH) analogues in reproductive medicine, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **34**, 1105-1113, doi: 10.1007/s10815-017-0977-4.
47. Tabibzadeh, S., and Hemmati-Brivanlou, A. (2006) Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events, *Stem Cells*, **24**, 1998-2006, doi: 10.1634/stemcells.2006-0075.
48. Jones, C., Kuehn, M., Hogan, B., Smith, J., and Wright, C. (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation, *Development*, **121**, 3651-3662.
49. Morikawa, M., Derynck, R., and Miyazono, K. (2016) TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, 8, doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
50. Papageorgis, P., and Stylianopoulos, T. (2015) Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review), *Int. J. Oncol.*, **46**, 933-943, doi: 10.3892/ijo.2015.2816.
51. Gatz, C., Oh, S., and Blobe, G. (2010) Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer, *Cell. Signal.*, **22**, 1163-1174, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.016.
52. Lawler, S., Feng, X., Chen, R., Maruoka, E., Turck, C., Griswold-Prenner, I., and Derynck, R. (1997) The type II transforming growth factor- β receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues, *J. Biol. Chem.*, **272**, 14850-14859, doi: 10.1074/jbc.272.23.14850.
53. Heldin, C., and Moustakas, A. (2016) Signaling receptors for TGF- β family members, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, 8, doi: 10.1101/cshperspect.a022053.
54. Ahmadi, A., Najafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2019) Transforming growth factor- β signaling: tumorigenesis and targeting for cancer therapy, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 12173-12187, doi: 10.1002/jcp.27955.
55. Wrana, J., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X., and Massagué, J. (1992) TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex, *Cell*, **71**, 1003-1014, doi: 10.1016/0092-8674(92)90395-S.
56. Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzén, P., Miyazono, K., and Heldin, C. (1994) Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β , *J. Biol. Chem.*, **269**, 20172-20178.
57. Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 753-791, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
58. Massagué, J., and Chen, Y. (2000) Controlling TGF-beta signaling, *Genes Dev.*, **14**, 627-644.
59. Feng, X., and Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in tgfbeta signaling through smads, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 659-693, doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.
60. Huang, T., David, L., Mendoza, V., Yang, Y., Villarreal, M., De, K., Sun, L., Fang, X., López-Casillas, F., Wrana, J., and Hinck, A. (2011) TGF- β signalling is mediated by two autonomously functioning T β RI:T β RII pairs, *EMBO J.*, **30**, 1263-1276, doi: 10.1038/emboj.2011.54.
61. Atfi, A., Dumont, E., Colland, F., Bonnier, D., L'héroguez, A., Prunier, C., Ferrand, N., Clément, B., Wewer, U., and Théret, N. (2007) The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF- β signaling through interaction with the type II receptor, *J. Cell Biol.*, **16**, 201-208, doi: 10.1083/jcb.200612046.
62. Kang, J., Liu, C., and Derynck, R. (2009) New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function, *Trends Cell Biol.*, **19**, 385-394, doi: 10.1016/j.tcb.2009.05.008.
63. Imamura, T., Oshima, Y., and Hikita, A. (2013) Regulation of TGF- β family signalling by ubiquitination and deubiquitination, *J. Biochem.*, **154**, 481-489, doi: 10.1093/jb/mvt097.
64. Zuo, W., Huang, F., Chiang, Y., Li, M., Du, J., Ding, Y., Zhang, T., Lee, H., Jeong, L., Chen, Y., Deng, H., Feng, X., Luo, S., Gao, C., and Chen, Y. (2013) C-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF- β type II receptor, *Mol. Cell*, **49**, 499-510, doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.002.
65. Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K., Porter, J., Lu, C., and Dijke, P. (2012) USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 717-726, doi: 10.1038/ncb2522.
66. Flotho, A., and Melchior, F. (2013) Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 357-385, doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311.
67. Mu, Y., Sundar, R., Thakur, N., Ekman, M., Gudey, S., Yakymovych, M., Hermansson, A., Dimitriou, H., Bengoechea-Alonso, M., Ericsson, J., Heldin, C., and Landström, M. (2011) TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer, *Nat. Commun.*, **2**, 330, doi: 10.1038/ncomms1332.
68. Li, S. B., and Jia-Fa Wu, J.-F. (2020) TGF- β /SMAD Signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment, *Rev. Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 41, doi: 10.1186/s13287-020-1552-y.
69. Nishita, M., Ueno, N., and Shibuya, H. (1999) Smad8B, a Smad8 splice variant lacking the SSXS site that inhibits Smad8-mediated signaling, *Genes Cells*, **4**, 583-591, doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00285.x.
70. Hill, C. (2009) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins, *Cell Res.*, **19**, 36-46, doi: 10.1038/cr.2008.325.
71. Wu, M., Chen, G., and Li, Y. (2016) TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease, *Bone Res.*, **4**, 16009, doi: 10.1038/boneres.2016.9.
72. Kang, J., Alliston, T., Delston, R., and Derynck, R. (2014) Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3, *EMBO J.*, **24**, 2543-2555.
73. Massagué, J. (2014) TGFbeta signalling in context, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 616-630, doi: 10.1038/nrm3434.
74. Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X., Meng, A., and Chen, Y. (2007) Smad7 antagonizes transforming growth factor signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4488-4499, doi: 10.1128/mcb.01636-06.
75. Gu, W., Monteiro, R., Zuo, J., Simões, F., Martella, A., Andrieu-Soler, C., Grosveld, F., Sauka-Spengler, T., and Patient, R. (2015) A novel TGF β modulator that uncouples R-Smad/I-Smad-mediated negative feedback from R-Smad/ligand-driven positive feedback, *PLoS Biol.*, **13**, doi: 10.1371/journal.pbio.1002051.
76. Thielen, N., van der Kraan, P., and van Caam, A. (2019) TGF β /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis, **8**, 9, doi: 10.3390/cells8090969.
77. Li, Y., Luo, W., and Yang, W. (2018) Nuclear transport and accumulation of Smad proteins studied by single-molecule microscopy, *Biophys. J.*, **114**, 2243-2251, doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.018.
78. Jin, Q., Gao, G., and Mulder, K. (2009) Requirement of a dynein light chain in TGF β /Smad3 signaling, *J. Cell. Physiol.*, **221**, 707-715, doi: 10.1002/jcp.21910.

79. Batut, J., Howell, M., and Hill, C. (2007) Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGF-β ligands, *Dev. Cell.*, **12**, 261-274, doi: 10.1016/j.devcel.2007.01.010.
80. Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors, *Genes Dev.*, **19**, 2783-2810, doi: 10.1101/gad.1350705.
81. Hill, C. (2016) Transcriptional control by the SMADs, *Cold Spring Harbor Persp. Biol.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a022079.
82. Qiao, B., Padilla, S., and Benya, P. (2005) Transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-β-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling, *J. Biol. Chem.*, **280**, 17562-17571, doi: 10.1074/jbc.M500646200.
83. Bhogal, R., Stoica, C., McGaha, T., and Bona, C. (2005) Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis, *J. Clin. Immun.*, **25**, 592-603, doi: 10.1007/s10875-005-7827-3.
84. Bell, D., Leung, K., Wheatley, S., Ng, L., Zhou, S., Ling, K., Sham, M., Koopman, P., Tam, P., and Cheah, K. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene, *Nat. Genet.*, **16**, 174-178, doi: 10.1038/ng0697-174.
85. Sen, R., Pezoa, S., Carpio, Shull, L., Hernandez-Lagunas, L., Niswander, L., and Artinger, K. (2018) Kat2a and Kat2b acetyltransferase activity regulates craniofacial cartilage and bone differentiation in Zebrafish and mice, *J. Dev. Biol.*, **12**, doi: 10.3390/jdb6040027.
86. Chen, X., Huang, H., Wang, H., Guo, F., Du, X., Ma, L., Zhao, L., Pan, Z., Gui, H., Yuan, T., Liu, X., Song, L., Wang, Y., He, J., Lei, H., and Gao, R. (2014) Characterization of zebrafish pax1b and pax9 in fin bud development, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 309385, doi: 10.1155/2014/309385.
87. Seoane, J., Le, H., Shen, L., Anderson, S., and Massagué, J. (2004) Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation, *Cell*, **117**, 211-223, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00298-3.
88. Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Tadokoro, Y., Ooshio, T., Kondo, Y., Nakao, S., Motoyama, N., and Hirao, A. (2010) TGF-β-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia, *Nature*, **463**, 676-680, doi: 10.1038/nature08734.
89. Kang, Y., Chen, C., and Massagué, J. (2003) A self-enabling TGFβ response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells, *Mol. Cell*, **11**, 915-926, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00109-6.
90. Vincent, T., Neve, E., Johnson, J., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P., Crystal, R., de Herreros, A., Moustakas, A., Pettersson, R., and Fuxe, J. (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-β mediated epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 943-950, doi: 10.1038/ncb1905.
91. Pardali, K., Kurisaki, A., Morén, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000) Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21Waf1/Cip1 regulation by transforming growth factor-β, *J. Biol. Chem.*, **275**, 29244-29256, doi: 10.1074/jbc.M909467199.
92. Baugé, C., Cauvard, O., Leclercq, S., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2011) Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: Involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta, *Arthritis Res. Ther.*, **13**, 23, doi: 10.1186/ar3247.
93. Blaney Davidson, E., Remst, D., Vitters, E., van Beuningen, H., Blom, A., Goumans, M., van den Berg, W., and van der Kraan, P. (2009) Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice, *J. Immunol.*, **182**, 7937-7945, doi: 10.4049/jimmunol.0803991.
94. Siomi, H., and Siomi, M. (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals, *Mol. Cell*, **38**, 323-332, doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.013.
95. Ha, M., and Kim, V. (2014) Regulation of microRNA biogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 509-524, doi: 10.1038/nrm3838.
96. Blahna, M., and Hata, A. (2012) Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis, *FEBS Lett.*, **586**, 1906-1912, doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.041.
97. Zhang, Y., Huang, X., and Yuan, Y. (2017) MicroRNA-410 promotes chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through down-regulating Wnt3a, *Am. J. Transl. Res.*, **9**, 136-145.
98. Lee, S., Yoon, D., Paik, S., Lee, K., Jang, Y., and Lee, J. (2014) MicroRNA-495 Inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9, *Stem Cells Dev.*, **23**, 1798-1808, doi: 10.1089/scd.2013.0609.
99. Creciente-Campo, J., Borrajo, E., Vidal, A., and Garcia-Fuentes, M. (2017) New scaffolds encapsulating TGF-β3/BMP-7 combinations driving strong chondrogenic differentiation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **114**, 69-78, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.12.021.
100. Wang, J., Sun, B., Tian, L., He, X., Gao, Q., Wu, T., Ramakrishna, S., Zheng, J., and Mo, X. (2017) Evaluation of the potential of rhTGF-β3 encapsulated P(LLA-CL)/collagen nanofibers for tracheal cartilage regeneration using mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord, *Mater. Sci. Eng.*, **70**, 637-645, doi: 10.1016/j.msec.2016.09.044.
101. Yanagawa, Y., Hiraide, S., and Iizuka, K. (2016) Isoform-specific regulation of transforming growth factor-β mRNA expression in macrophages in response to adrenoceptor stimulation, *Microbiol. Immunol.*, **60**, 56-63, doi: 10.1111/1348-0421.12344.
102. Frangogiannis, N. G. (2017) The role of transforming growth factor (TGF)-β in the infarcted myocardium, *J. Thor. Dis.*, **9**, 52-63, doi: 10.21037/jtd.2016.11.19.
103. Luo, Z., Jiang, L., Xu, Y., Li, H., Xu, W., Wu, S., Wang, Y., Tang, Z., Lv, Y., and Yang, L. (2015) Mechano growth factor (MGF) and transforming growth factor (TGF)-β3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model, *Biomaterials*, **52**, 463-475, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.001.
104. Yang, S. S., Jin, L. H., Park, S. H., Kim, M. S., Kim, Y. J., Choi, B. H., Lee, C. T., Park, S. R., and Min, B. H. (2016) Extracellular matrix (ECM) multilayer membrane as a sustained releasing growth factor delivery system for rhTGF-β3 in articular cartilage repair, *PLoS One*, **11**, e0156292, doi: 10.1371/journal.pone.0156292.
105. Yang, Q., Teng, B. H., Wang, L. N., Li, K., Xu, C., Ma, X. L., Zhang, Y., Kong, D. L., Wang, L. Y., and Zhao, Y. H. (2017) Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF-β3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells, *Int. J. Nanomed.*, **12**, 6721-6733, doi: 10.2147/IJN.S141888.
106. Wang, X., Li, Y., Han, R., He, C., Wang, G., Wang, J., Zheng, J., Pei, M., and Wei, L. (2014) Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-β3 gene promoted pig cartilage defect repair, *PLoS One*, **9**, e116061, doi: 10.1371/journal.pone.0116061.

107. Sun, Q., Zhang, L., Xu, T., Ying, J., Xia, B., Jing, H., and Tong, P. (2018) Combined use of adipose derived stem cells and TGF- β 3 microspheres promotes articular cartilage regeneration *in vivo*, *Biotech. Histochem.*, **93**, 168-176, doi: 10.1080/10520295.2017.1401663.
108. Zhou, M., Lozano, N., Wychowaniec, J. K., Hodgkinson, T., Richardson, S. M., Kostarelos, K., and Hoyland, J. A. (2019) Graphene oxide: a growth factor delivery carrier to enhance chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D hydrogels, *Acta Biomater.*, **96**, 271-280, doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.027.
109. Rothrauff, B., Sasaki, H., Kihara, S., Overholt, K., Gottardi, R., Lin, H., Fu, F., Tuan, R., and Alexander, P. (2019) Point-of-care procedure for enhancement of meniscal healing in a goat model utilizing infrapatellar fat pad-derived stromal vascular fraction cells seeded in photocrosslinkable hydrogel, *Am. J. Sports Med.*, **47**, 3396-3405, doi: 10.1177/0363546519880468.

EVALUATION OF Tgf β 3 CYTOKINE MECHANISM OF ACTION AS A THERAPEUTIC AGENT FOR INCREASING SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS IN HYALINE CARTILAGE

Review

M. S. Bozhokin^{1,2*}, Y. V. Sopova^{3,4,5}, D. V. Kachkin^{4,5}, A. A. Rubel^{4,5}, and M. G. Khotin²

¹ Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R. R. Vreden,
195427 St. Petersburg, Russia; E-mail: writeback@mail.ru

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, 194064 St. Petersburg, Russia

³ St. Petersburg subsidiary of Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science,
199034 St. Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, Faculty of Biology, 199034 St. Petersburg, Russia

⁵ St. Petersburg State University, Faculty of Biology, Laboratory of Amyloid Biology, 199034 St. Petersburg, Russia

Received January 4, 2020

Revised February 26, 2020

Accepted February 26, 2020

Hyaline cartilage is forming a nonvascular connective tissue of the joints surface, consisting mostly from extracellular matrix proteins and a small number of highly differentiated chondrocytes cells. Nowadays are investigated a various techniques for repairing a joint surfaces damages, for example, the using of modified cell culture and biodegradable scaffolds. Molecular mechanisms of cartilage tissue proliferation are being actively studied during recent years. One of the most important proteins among cytokines and growth factors affecting the chondrogenesis is Tgf β 3, which plays a critical role in normal cartilage tissue proliferation. Via direct interaction with ligands on the surface of cell membrane, Tgf β 3 triggers a cascade of molecular interactions involving transcription factor Sox9. In this review we study the effect of Tgf β 3 on the receptor complex activation and subsequent intracellular movement of the associated Smad mediators. An analysis and the relation of these processes and a major extracellular matrix genes, such as *col2a1* and *acan* expression increase is also presented.

Keywords: Tgf β 3, mechanism of action, hyaline cartilage, Smad proteins, extracellular matrix

БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС NDC80: СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПАТОФИЗИОЛОГИИ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ

Обзор

© 2020 Н.Б. Устинов¹, А.В. Коршунова^{1,2}, Н.Б. Гудимчук^{1,2*}

¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: gudimchuk@phys.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
физический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.01.2020

После доработки 02.03.2020

Принята к публикации 02.03.2020

Митотическое деление поддерживает генетическую идентичность любого многоклеточного организма начиная с дробления зиготы и на протяжении всей жизни. Равномерное распределение хромосомного материала между дочерними клетками всякий раз обеспечивает веретено деления, которое формируется во время митоза из микротрубочек — динамических полимеров белка тубулина. Микротрубочки закрепляются своими концами за специализированный суперкомплекс белков на хромосомах, называемый кинетохором. Настоящий обзор посвящен одному из наиболее важных элементов кинетохора, 4-субъединичному комплексу NDC80, который играет главную роль в прикреплении собирающихся и разбирающихся концов микротрубочек к хромосомам. Систематизированы литературные данные о структуре, свойствах и известных механизмах регуляции работы комплекса NDC80 в живых клетках; также обсуждаются работы, рассматривающие изменения нормальной экспрессии генов комплекса NDC80 в контексте нарушений клеточного деления и онкогенеза. Обращается внимание на диагностический и терапевтический потенциал этого белкового комплекса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митоз, веретено деления, микротрубочки, кинетохор, фосфорегуляция, ингибирование митоза, NDC80, антимитотики.

DOI: 10.31857/S0320972520040053

Митотическое деление — решающее событие в жизненном цикле любой эукариотической клетки. От того, насколько успешно оно завершится, зависит не только судьба ее прямых потомков, но и, в конечном счете, генетическая идентичность всего многоклеточного организма. Хромосомы равномерно распределяются между дочерними клетками в результате точной работы митотического аппарата клетки, в основе которого лежит так называемое веретено деления [1]. Оно формируется в прометафазе митоза из микротрубочек — протяженных полимеров белков α - и β -тубулина [2, 3] (рис. 1). Эти динамические структуры присоединяются своими растущими (+)-концами к центромерным участкам реплицированных хромосом [4] и обеспечивают при своей дальнейшей разборке правильное расхождение сестринских хроматид в анафазе митоза

[5]. Площадками для прикрепления микротрубочек к хроматидам служат кинетохорные комплексы [6], включающие 50–60 различных белков у почкующихся дрожжей [7, 8] и >100 у высших эукариот, включая человека [9, 10].

Среди кинетохорных белков, отвечающих за прикрепление к микротрубочкам, центральную роль играет комплекс NDC80. Будучи компонентом т.н. KMN-сети (KNL1/MIND(Mis12)/NDC80) [11], он участвует в сборке митотического веретена и прохождении соответствующей контрольной точки [12].

Комплекс NDC80 обнаружен в кинетохорах большинства эукариот, включая царства грибов, растений и животных. У дрожжей кинетохоры устроены проще и более приспособлены к взаимодействию с малым количеством микротрубочек. По имеющимся оценкам, каждый дрожжевой кинетохор имеет в своем составе 5–10 копий комплексов NDC80 [13, 14]. Кинетохоры животных организмов сложнее: они оптимизированы для транспорта хромосом на большие

Принятые сокращения: а.о. — аминокислотные остатки.

* Адресат для корреспонденции.

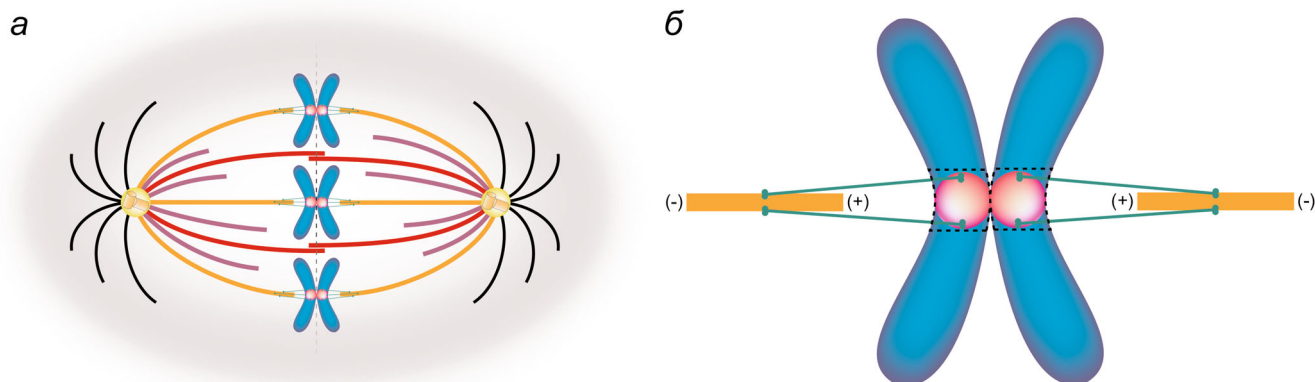


Рис. 1. Комплекс NDC80 опосредует взаимодействие микротрубочек с хромосомами во время митоза: *a* — схема веретена деления; *б* — биориентированное закрепление хромосомы за микротрубочки. Показаны микротрубочки, хромосомы и кинетохоры (в виде кружков на хромосомах). Для пары кинетохорных микротрубочек, прикрепленных к сестринским хроматидам, отмечены (–) и (+)-концы. Штриховая линия обозначает плоскость метафазной пластинки, а замкнутые штриховые контуры очерчивают центромерные участки хромосом, куда прикрепляются кинетохоры. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

расстояния, и, как правило, связываются со множеством микротрубочек одновременно. На каждом кинетохоре человека в норме находится ~ 240 копий комплексов NDC80 [15], что соответствует ~ от 14 до 20 молекул этого комплекса на каждую связанную с кинетохором микротрубочку [15, 16]. Увеличение числа молекул NDC80 коррелирует с неправильным распределением сестринских хроматид в ходе митоза и образованием анеуплоидных клеток со склонностью к злокачественной пролиферации [17].

Центральная роль NDC80 в клеточном делении и многочисленные указания на корреляцию нарушений экспрессии его генов [18–22] с развитием опухолей делают этот комплекс потенциальной мишенью для разработки антимитотических противораковых лекарств нового поколения. Несмотря на ряд попыток, к нему до сих пор не подобрано ни одного лиганда с приемлемым сродством и очевидным терапевтическим потенциалом. Возможно, что детальный анализ структуры, партнеров по связыванию и функционального состояния NDC80, которому посвящен наш обзор, поможет уточнить тактику и стратегию дальнейшего поиска подобных препаратов.

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА NDC80

Субъединичная и доменная архитектура. Комплекс NDC80 представляет собой гетеротетрамер, состоящий из четырех субъединиц — Hec1 (Ndc80 у дрожжей), Nuf2, Spc24 и Spc25 [23] (рис. 2). Интерфейс его взаимодействия с

микротрубочкой представлен доменами Hec1 и Nuf2 [24–27]; за прикрепление NDC80 к белкам внутреннего кинетохора отвечают Spc24 и Spc25 [24, 28, 29]. Hec1 и Nuf2 соединяются в гетеродимер за счет суперспирализации С-концевых [23, 26], а Spc24 и Spc25 — N-концевых фрагментов [23, 26, 30]. При этом С-конец Hec1 (Ndc80) выдается на ~ 80 а.о. относительно С-конца Nuf2, а N-конец Spc24 — на ~ 20 а.о. по сравнению с N-концом Spc25 [23], что позволяет субкомплексам Hec1(Ndc80)/Nuf2 и Spc24/Spc25 соединиться и образовать полнофункциональный комплекс NDC80 [23, 31]. В результате сборки образуется суперспираль длиной ~ 515 Å с участком 4-х α-спиралей протяженностью 20 а.о. (~ 3 гептадных повторов) на стыке субкомплексов Hec1(Ndc80)/Nuf2 и Spc24/Spc25 [23, 31]. Глобулярные головки, на долю которых приходятся 10% общей длины комплекса, окаймляют этот фибриллярный стержень с обоих концов.

С-концевые домены Spc24 и Spc25 формируют со стороны кинетохора структуру с псевдосимметрией 2-го порядка [30]. С противоположного конца суперспирали располагается Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуль, образованный N-концевыми кальпонин-гомологичными доменами обеих субъединиц. Структурно каждый такой домен представлен шестью α-спиралями (α1–α6) [30]. Кальпонин-гомологичный домен в составе Hec1(Ndc80)-субъединицы отделен от фибриллярного продолжения шпилькой α-спиралей [31]. Похожие домены также присутствуют в белках семейства EB, связывающихся с растущими концами [32].

Конформационная подвижность и ее предпосылки. В структуре Spc24/Spc25 суперспирализованные фрагменты соединены с С-концевыми доменами слабо структурированными перемычками. У Spc24 такая перемычка образована а.о. со 126-го по 157-й, а у Spc25 — со 117-го по 133-й [30]. Поскольку участки полипептидных цепей богаты пролинами и глицинами, предполагается, что они образуют относительно гибкий «шарнир» между глобулярным Spc24/Spc25-модулем и фибриллярным стержнем комплекса NDC80. Аналогично «головка» Hec1(Ndc80)/Nuf2-гетеродимера может отклоняться на 30° от оси суперспирали [31].

Помимо всего прочего, глобулярные участки Hec1(Ndc80)/Nuf2- и Spc24/Spc25-гетеродимеров способны менять взаимную ориентацию за счет гибкости самого фибриллярного стержня, которую придает ему выпетливание в С-концевом фрагменте Hec1 между связывающим микротрубочки Hec1(Ndc80)/Nuf2-модулем и местом стыка двойных суперспиралей от разных субкомплексов (рис. 2). Петля включает 50–100 а.о., не вовлеченных в суперспирализацию, 10 из которых, предположительно, образуют β -тяж [26, 33]. По данным электронной микроскопии с негативным контрастированием об-

разцов, в точке излома фибриллярный стержень может сгибаться на угол от 0 до 120° и скручиваться вдоль своей оси на 90° в обе стороны [33].

Гибкая петля NDC80 образует дополнительный интерфейс для связывания других белков и их комплексов (Ska1-3, Cdt1 и т. д.) [34–37]. Так, например, у почкующихся дрожжей она участвует в правильном позиционировании комплекса NDC80 не на латеральной поверхности микротрубочки, а на ее (+)-конце за счет взаимодействия петли и DASH-комплекса [38]. Кроме того, наличие петли придает жесткому фибриллярному стержню способность изгибаться, что может быть важно в работе кинетохора. Так, у почкующихся дрожжей расстояние между N-концом Ndc80 и С-концом Spc24 меняется в разные фазы митоза [39]. В метафазе оно составляет 55 нм, что примерно соответствует полной длине комплекса. Впрочем, 15 из этих 55 нм приходится на неструктурированный N-концевой «хвост» Ndc80 (113 а.о.), после удаления ($\Delta 113$ -Ndc80) которого проекция того же расстояния на ось взаимодействия между кинетохором и микротрубочкой составляет уже 40 нм [14]. В поздней анафазе (при расхождении полюсов) расстояние между субъединицами Ndc80 и Spc24 сокращается до 35 нм, учитывая нест-

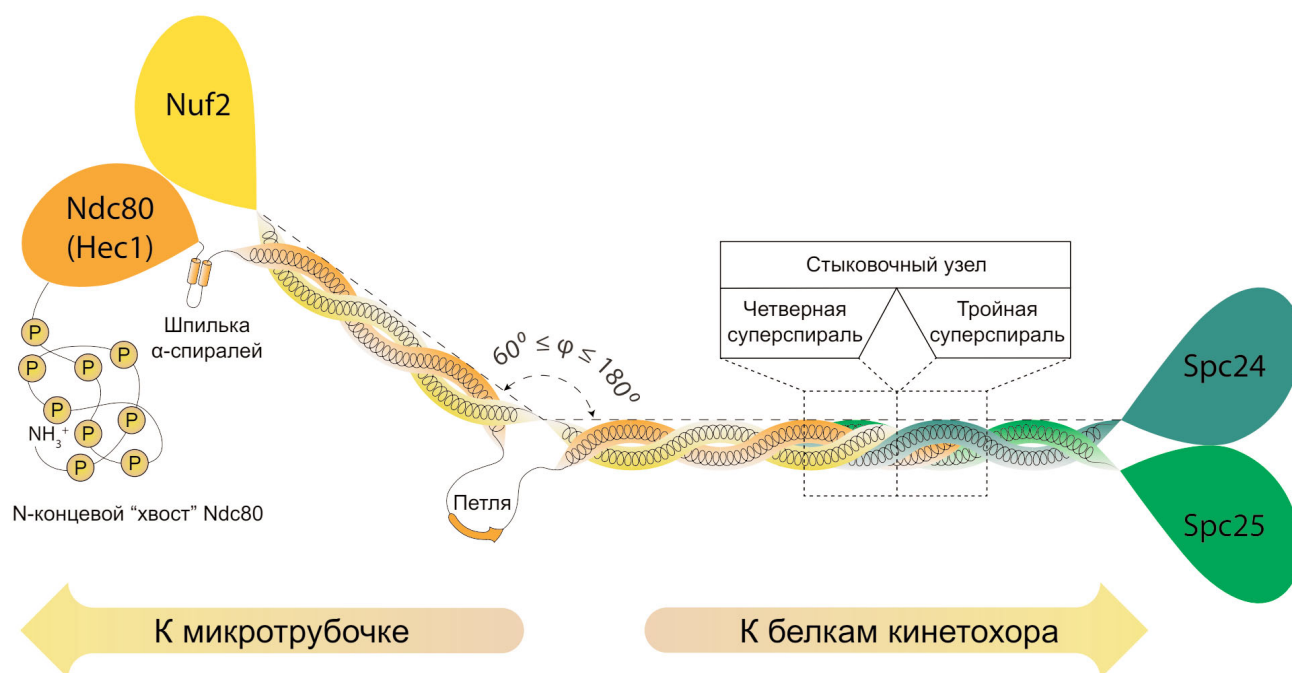


Рис. 2. Субъединичная/доменная архитектура и конформационная подвижность комплекса NDC80. Ключевые структурные элементы NDC80 подписаны непосредственно на рисунке. Сайты фосфорилирования в N-концевом «хвосте» Ndc80-субъединицы показаны кружками. Диапазон значений угла φ демонстрирует, в каких пределах фибриллярный стержень NDC80 способен изгибаться в плоскости рисунка.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

руктурированный хвост, что косвенно свидетельствует о переходе NDC80 из выпрямленной в изогнутую конформацию. Все это указывает на то, что комплекс выпрямляется под действием сил натяжения, которые возникают в метафазе [39]. Эксперименты по фёрстеровскому резонансному переносу энергии *in vitro* обнаружили еще одну, экстремально изогнутую конформацию NDC80 [40]. Предполагается, что конформация и степень изогнутости NDC80 влияют на доступность сайтов фосфорилирования комплекса для киназы Aurora B, что позволяет проводить проверку правильности сборки веретена деления [41].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА NDC80 С МИКРОТРУБОЧКОЙ

Роль глобулярных доменов Hec1(Ndc80) и Nuf2. Как уже было отмечено, ключевую роль в связывании комплекса NDC80 с (+)-концами микротрубочек играет глобулярный Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуль. Комплекс NDC80 сохраняет способность к взаимодействию с микротрубочками вне зависимости от наличия Spc24/Spc25-«головки» и длины суперспирального фрагмента. Так, рекомбинантному белковому комплексу NDC80^{bonsai}, в котором первые 286 а.о. Ndc80 слиты с последними 107 а.о. Spc25, а первые 169 а.о. Nuf2 — с последними 76 а.о. Spc24, укороченный в 7 раз фибриллярный стержень несколько не мешает связываться с микротрубочками *in vitro* [26]. То же касается изолированного гетеродимера Ndc80/Nuf2 — как полноразмерного [25], так и с частично обрезанными C-концевыми суперспирализованными участками (Ndc80-Δ135/Nuf2-Δ112 или «Broccoli») [40].

Аминокислотные остатки, формирующие интерфейс взаимодействия комплекса NDC80 с микротрубочкой, кластеризуются в двух положительно заряженных островках на поверхности глобулярного Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуля (рис. 3). Эксперименты *in vitro* с человеческим NDC80^{bonsai} показали, что наибольший вклад в связывание вносят 3 остатка лизина — K89 и K166 в Ndc80-субъединице, а также K115 в Nuf2-субъединице [26]. При замене любого из них остатками глутаминовой кислоты или аланина константа диссоциации увеличивается в 30–50 или ~ 6 раз соответственно. Таким образом, инверсия заряда сильнее, чем его обнуление, влияет на присоединение комплекса к микротрубочке, что указывает на существенный вклад электростатических взаимодействий в связывание. Интерфейс взаимодействия Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуля с микротрубочкой не

ограничивается тремя упомянутыми остатками лизина. Так, мутации K146E и K156E в Ndc80, а также K33E и K41E в Nuf2 умеренно (в 6–12 раз) ухудшают связывание человеческого NDC80^{bonsai} с микротрубочками *in vitro*. Наконец, чуть слабее влияют на связывание с микротрубочкой замены K123A, H176A в Ndc80 и K29A, N39A в Nuf2 [26].

Ключевая роль остатков лизина, существенно влияющих на константу диссоциации комплекса NDC80 от микротрубочки *in vitro*, отчасти подтверждается и наблюдениями *in vivo*. В живых клетках аналогичные вышеперечисленным мутации в белке Hec1 действительно приводят к существенным нарушениям в протекании митоза. В частности, мутация Hec1^{K166D} ведет к уменьшению вероятности формирования метафазной пластинки в 15 раз [27]. О количестве контактов между микротрубочкой и кинетохором можно также судить по числу стабилизированных данными контактами микротрубочек, которые не деполимеризуются при холодной обработке. Таких микротрубочек, а значит, и контактов между ними и кинетохорами становится меньше, если в белке Ndc80 присутствуют мутации [27].

Что касается глобулярного домена белка Nuf2, то точечная инверсия заряда в нем в положениях K33, K41 и даже K115 (в отличие от экспериментов *in vitro*), практически не препятствует выравниванию метафазных хромосом в экспериментах *in vivo*. Для единичных замен (мутанты Nuf2^{K33D}, Nuf2^{K41D} и Nuf2^{K115D}) наблюдается лишь задержка клетки в метафазе на 47, 21 и 42% больше нормы, соответственно. При введении двойных и тройных мутаций (Nuf2^{K33D/K41D} и Nuf2^{K33D/K41D/K115D}) доля клеток со сформированной метафазной пластинкой падает с 56 до 25% [27]. Приведенные данные о роли мутаций в Nuf2 *in vivo* могут быть интерпретированы как указание на ограниченный вклад Nuf2-субъединицы в связывание с микротрубочками в клетках или же могут объясняться наличием механизмов компенсации эффектов точечных мутаций Nuf2 *in vivo*. Тем не менее, вырезание целого кальпонин-гомологичного домена белка Nuf2 (Δ142–Nuf2) полностью блокирует клетки в прометафазе [27]. Впрочем, неизвестно, влияет ли столь обширная делеция только на взаимодействие Nuf2 с микротрубочкой или еще и на конформацию соседней Ndc80-субъединицы — в частности, на ориентацию ее N-концевого «хвоста».

Роль N-концевого «хвоста» Hec1(Ndc80) в регуляции аффинности взаимодействия с микротрубочками. N-концевой «хвост» белка Hec1(Ndc80), аналог которого отсутствует в структуре белка

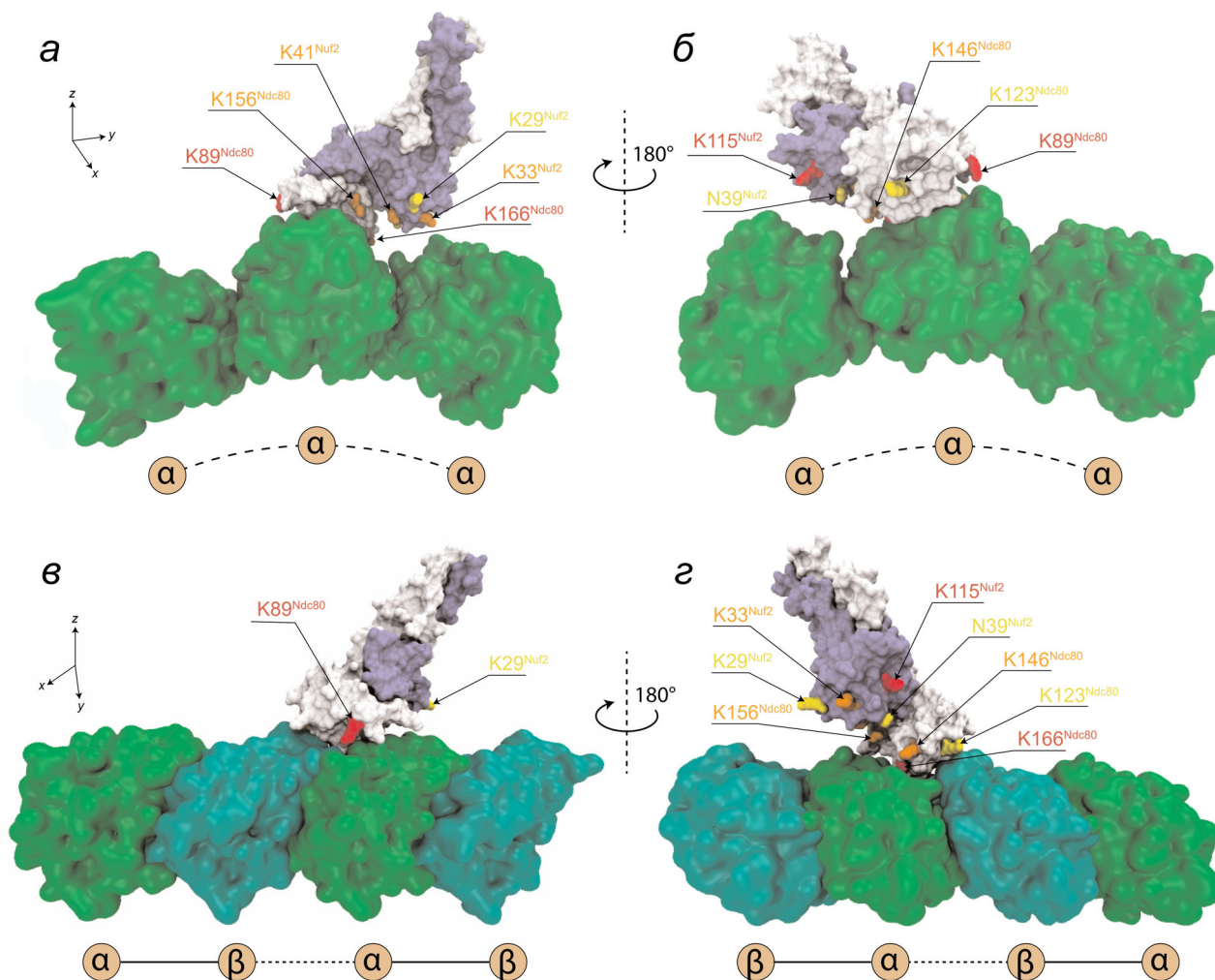


Рис. 3. Связывание глобулярного Hec1/Nuf2-модуля NDC80 с поверхностью микротрубочки: *a* – вид перпендикулярно оси микротрубочки; *б* – то же, с разворотом на 180° вокруг оси *z*; *в* – вид вдоль отдельного протофиламента; *г* – то же, с разворотом на 180° вокруг оси *z*. Результирующие структуры получены наложением pdb-структур 3IZ0 и 6BJS в программе молекулярной визуализации VMD (Иллинойский университет в Урбане-Шампейне, США). Поперечный срез микротрубочки (*a* и *б*) ограничен тремя мономерами α -тубулина из смежных протофиламентов, а отдельный протофиламент (*в* и *г*) – двумя тубулиновыми α/β -димерами. Латеральные контакты между тубулиновыми мономерами обозначены штриховыми, а интра- и интердимерные продольные контакты – сплошными и пунктирными линиями, соответственно. Для наглядности показано связывание Hec1/Nuf2-головки: *a* и *б* – только с одним мономером α -тубулина; *в* и *г* – только на стыке между тубулиновыми α/β -димерами. Выделены отдельные а.о. Hec1 и Nuf2, сильно, умеренно и слабо вовлеченные во взаимодействие с тубулином. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/bioikhsn/>

Nuf2, дополнительно стабилизирует взаимодействие комплекса NDC80 с поверхностью микротрубочки [24–27, 42, 43]. Этот богатый лизинами фрагмент длиной 80 а.о. не имеет четкой структуры, что затрудняет исследование его трехмерной укладки при взаимодействии NDC80 комплекса с тубулинами в микротрубочке экспериментальным путем. Для остальной части белкового комплекса NDC80^{bonsai} удалось получить информацию о молекулярном строении с относительно неплохим разрешени-

ем [26]. Не исключено, что *N*-концевой хвост субъединицы Hec1 узнает такой же слабоструктурированный *C*-концевой фрагмент α - или β -тубулина [26, 43]. При повышении ионной силы раствора *N*-концевой «хвост» Hec1 отсоединяется от *C*-конца тубулина, несущего избыточный отрицательный заряд из-за множества остатков глутамата и аспартата, что иллюстрирует ключевую роль электростатических взаимодействий в таком узнавании [43]. Человеческие и дрожжевые мутанты, лишенные *N*-конце-

вого «хвоста» ($\Delta 80\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ и $\Delta 80\text{-Ndc80/Nuf2}$, соответственно) *in vitro* связываются с микротрубочками на 1–2 порядка хуже, чем их полноразмерные прототипы [25, 26]. Эксперименты *in vivo* дают сходную картину: в клеточных линиях, продуцирующих укороченный вариант человеческого Hec1 ($\Delta 80\text{-Hec1}$), среднее количество микротрубочек, связанных с одним кинетохором, уменьшается с ожидаемых 19,5 до 2,8 [42]. Изолированный «хвост» человеческого Hec1 (Hec1(1–80)) и сам присоединяется к микротрубочке с $K_d \sim 0,64$ мкМ. Более длинный фрагмент Hec1, содержащий еще и кальпонин-гомологичный домен (Hec1(1–230)), связывается с ними чуть хуже ($K_d \sim 1,0$ мкМ), а кальпонин-гомологичный домен сам по себе (Hec1(81–230)) – крайне слабо [43].

N-концевой «хвост» человеческого Ndc80(Hec1) содержит 9 остатков серина/треонина (S4, S5, S8, S15, S44, T49, S55, S62 и S69), как минимум 7 из которых являются мишенями внутриклеточных Аугоа-киназ A и B [24, 26, 44, 45]. Фосфорилирование этих а.о., которое нейтрализует положительный заряд «хвоста», сопряжено с отсоединением комплексов NDC80 от микротрубочки *in vitro* [11, 26] и с ослаблением контактов между микротрубочкой и кинетохором *in vivo* [46]. Аугоа-киназа B, как и ее дрожжевой гомолог Ipl1 [47], динамически регулирует прочность этих контактов при переходе из одной фазы митоза в другую, редактируя профиль фосфорилирования NDC80 в тандеме с фосфатазой PP1 [48].

По имеющимся данным, пока веретено деления не сформировано, Hec1-«хвост» несет больше всего фосфатных групп (до 4-х в профазе и до 2-х в прометафазе) [46, 49, 50], из которых в метафазе остается максимум одна (S69-P), изначально вносимая Аугоа-киназой A [45, 49]. Параллельно доля ассоциированного с микротрубочками комплекса NDC80 возрастает с 17% в прометафазе до 33% в метафазе [50]. Сами же микротрубочки с каждой следующей фазой деления всё менее активно перераспределяются между разными кинетохорами [24, 49], что также свидетельствует о большем сродстве дефосфорилированного NDC80 к полимеризованному тубулину.

Эксперименты с фосфомиметическими мутантами NDC80 подтверждают регуляторную роль Аугоа-киназ в клетке и значимость модификаций, вносимых этими ферментами [24, 27, 42, 45, 49–54]. Одновременная замена всех 9 остатков серина и треонина на остатки аспарагиновой кислоты в человеческом Hec1 (9D-Hec1) в 10 раз ухудшает сродство NDC80 к микротрубочкам *in vitro* [54] и приводит к разбалансиро-

вке веретена деления *in vivo* [27, 42, 50]. Так, в клетках, продуцирующих 9D-Hec1, с (+)-концами микротрубочек ассоциировано всего 20% кинетохоров – примерно столько же, что и в случае «бесхвостого» мутанта $\Delta 80\text{-Hec1}$. В норме же к началу метафазы к 80% всех кинетохоров прикрепляется хотя бы одна микротрубочка [42]. Примечательно, что нефосфорилируемый мутант с беззарядными остатками аланина в тех же положениях (9A-Hec1) не снижает плотность контактов между микротрубочками и кинетохорами, хотя и не позволяет хромосомам выравниваться по экватору делящейся клетки [42, 45]. Это согласуется с избыточной прочностью таких контактов в 9A-Hec1-продуцирующих клетках, где с микротрубочками ассоциировано в 1,7 раза больше комплексов, чем в случае Hec1 дикого типа [50].

In vitro белковые комплексы NDC80 с фосфомиметическими заменами только в 7 подтвержденных из 9 известных сайтов фосфорилирования (7D-NDC80^(bonsai)) в 3–5 раз хуже связываются с микротрубочками по сравнению с нативным комплексом [52, 53]. Так, в экспериментах с лазерной ловушкой кинетохорные частицы, содержащие фосфомиметический мутант 7D-NDC80, могут удерживаться на концах микротрубочек под силой до 5,7 пН (при норме в 9,1 пН) [53]. В клетках, продуцирующих 7D-NDC80, вероятность формирования метафазной пластинки падает в 5,8 раз [52]. Замена семи аминокислот в сайтах фосфорилирования на аланины (7A-NDC80) почти не влияет ни на сродство комплекса к микротрубочке, ни на устойчивость контактов между микротрубочками и кинетохорами к растяжению [53].

В опытах *in vitro* фосфомиметические мутации [51, 52], как и удаление 80 а.о. с *N*-конца Ndc80 (Hec1) [26], не только нарушают взаимодействие NDC80 с полимеризованным тубулином, но и дезорганизуют кластеризацию комплекса на поверхности микротрубочки, что было интерпретировано как указание на возможный кооперативный вклад Ndc80(Hec1)-«хвоста» в связывание. Согласно данным электронной микроскопии [52], при большой концентрации NDC80^(bonsai) образует кластеры на микротрубочках. Если типичный NDC80^(bonsai)-кластер содержит 3–6 молекул комплекса, то 3D-NDC80^(bonsai) и 4D-NDC80^(bonsai) образуют скопления по 2–3 молекулы [51], а 7D-NDC80^(bonsai) и $\Delta 80\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ – не более 2 молекул [52]. Отсечение половины Hec1-«хвоста», на которую приходятся остатки S5, S8 и S15, а также S4 ($\Delta 40\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$), очень слабо влияет на средний размер кластера [52]. Благодаря этим наблюдениям (вместе со структурными реконструкциями)

возникла гипотеза о том, что две зоны в пределах «хвоста», разделенные богатым пролином линкером, по-разному регулируют посадку NDC80 на микротрубочку. Alushin et al. предложили зональную гипотезу, согласно которой участок, где сосредоточены а.о. S44, S55, и S69, а также T49 и S62 (зона 1, а.о. 44–69), в дефосфорилированном виде взаимодействует с подвижным отрицательно заряженным C-концом тубулина, а N-концевой фрагмент NDC80 слабо контактирует со смежной молекулой комплекса в кластере. Согласно их экспериментальным данным, фосфорилирование а.о. S5, S8, S15 и, возможно, S4 в зоне 2 (а.о. 4–15) дестабилизирует взаимодействия комплексов NDC80 друг с другом и сводит на нет кооперативность связывания этих комплексов с микротрубочкой [52]. В согласии с этой гипотезой, а.о. S8 и S15, в отличие от S44 и S55, действительно защищены от спонтанного рефосфорилирования по ходу митоза, что указывает на недоступность зоны 1 для Аутога-киназы после оформления контактов между микротрубочкой и кинетохором. Зона 2 в метафазе остается, напротив, открыта для многократного ре- и дефосфорилирования, что, предположительно, порождает хромосомные осцилляции *in vivo* [46].

В противоречии с зональной моделью Алушина находятся данные Zaytsev et al. [49, 54]. В этих работах последовательное введение всё большего числа фосфомиметических замен (от 1D-NDC80^{bonsai} (S8D) до 9D-NDC80^{bonsai}) *in vitro* постепенно ослабляло взаимодействие комплекса с микротрубочкой, но почти не влияло на прочность смежных NDC80-NDC80 контактов. Кооперативность связывания во всех случаях была настолько мала, что кластеризовалось лишь ~ 10% молекул комплекса, причем 8% связывались с микротрубочками в виде димеров. Поскольку в клетке на одну кинетохорную микротрубочку приходится не более 20 молекул NDC80 [15, 16], исследователи пришли к выводу, что кооперативные эффекты почти не вносят вклада в формирование контактов между микротрубочками и кинетохорами *in vivo*, а числом фосфатных групп в Ndc80(Hec1)-«хвосте» экспериментально регулируется только прочность этих отдельно взятых контактов [54].

Роль глобулярного Spc24/Spc25-модуля комплекса NDC80. Эффект автоингибирования. NDC80 может частично подавлять свое присоединение к микротрубочкам [11, 40]. Феномен автоингибирования связан с тем, что комплекс способен переходить в экстремально изогнутое состояние [40]. В такой конформации глобулярный Spc24/Spc25-модуль настолько сближается с Nuf2/Hec1-«головкой», что частично загора-

живает интерфейс ее контакта с поверхностью микротрубочки и ослабляет связывание. Так, дрожжевой белковый комплекс NDC80-«Broccoli» без Spc24/Spc25-модуля и части фибриллярного стержня (Ndc80-Δ135/Nuf2-Δ112) в 1,9 раза дольше остается связан с поверхностью микротрубочки, чем полноразмерный NDC80. Эксперименты с флуоресцентными метками на концах комплекса показали, что автоингибирование происходит за счет изгибания NDC80, а исчезновение сигнала Ферстеровского резонансного переноса энергии при делении 30 а.о. (Δ490-510) в Ndc80-субъединице подтвердило участие шарнирной петли в таком изгибании [40].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА NDC80 С ДРУГИМИ КИНЕТОХОРНЫМИ БЕЛКАМИ

Кинетохорные рецепторы NDC80. Основную роль в присоединении комплекса NDC80 к кинетохору играет комплекс Mis12, гомолог которого у дрожжей носит название MIND (рис. 4, а, б). Комплекс MIND (Mis12) состоит из четырех субъединиц: Mtw1/Nnf1/Nsl1/Dsn1 [11, 29, 55]. Комплекс NDC80 присоединяется к нему за счет взаимодействия глобулярных доменов Spc24/Spc25 с субъединицами Nsl1/Dsn1 Mis12(MIND)-комплекса [28, 56]. У NDC80 интерфейс взаимодействия с MIND(Mis12)-комплексом формируют а.о. 136–213 и 116–221 в C-концевых доменах Spc24 и Spc25. Комплекс MIND (Mis12) соединяет NDC80 с белком KNL1 и с белком CENP-C у человека (Mif2 у дрожжей) [57, 58]. Последний непосредственно взаимодействуют с центромеро-специфическим гистоном CENP-A (Cse4 у дрожжей), определяющим локализацию всего кинетохора на хромосоме (рис. 4, а, б). На ключевую роль Mis12 в локализации комплекса NDC80 на кинетохорной пластинке указывают эксперименты с мутантами. Так, у дрожжей удаление Dsn1-субъединицы MIND-комплекса (Δdsn) является летальным [59]. Кроме того, нежизнеспособные мутанты возникают при изменении интерфейса взаимодействия путем внесения аминокислотных замен: Spc24^{L160D}, Spc25^{V159D} или Dsn1^{L562D/L563D}, Dsn1^{-Δ29} [29].

Интересно, что мутации, вносимые в Mis12, в клеточных линиях человека не всегда летальны, как в случае дрожжей. Нокаут человеческого Mis12, в отличие от дрожжевого MIND-комплекса, не фатален, хотя и чреват хромосомными дефектами и задержкой митоза из-за вчетверо меньшего количества NDC80 на кинетохоре [60]. Это свидетельствует о существовании

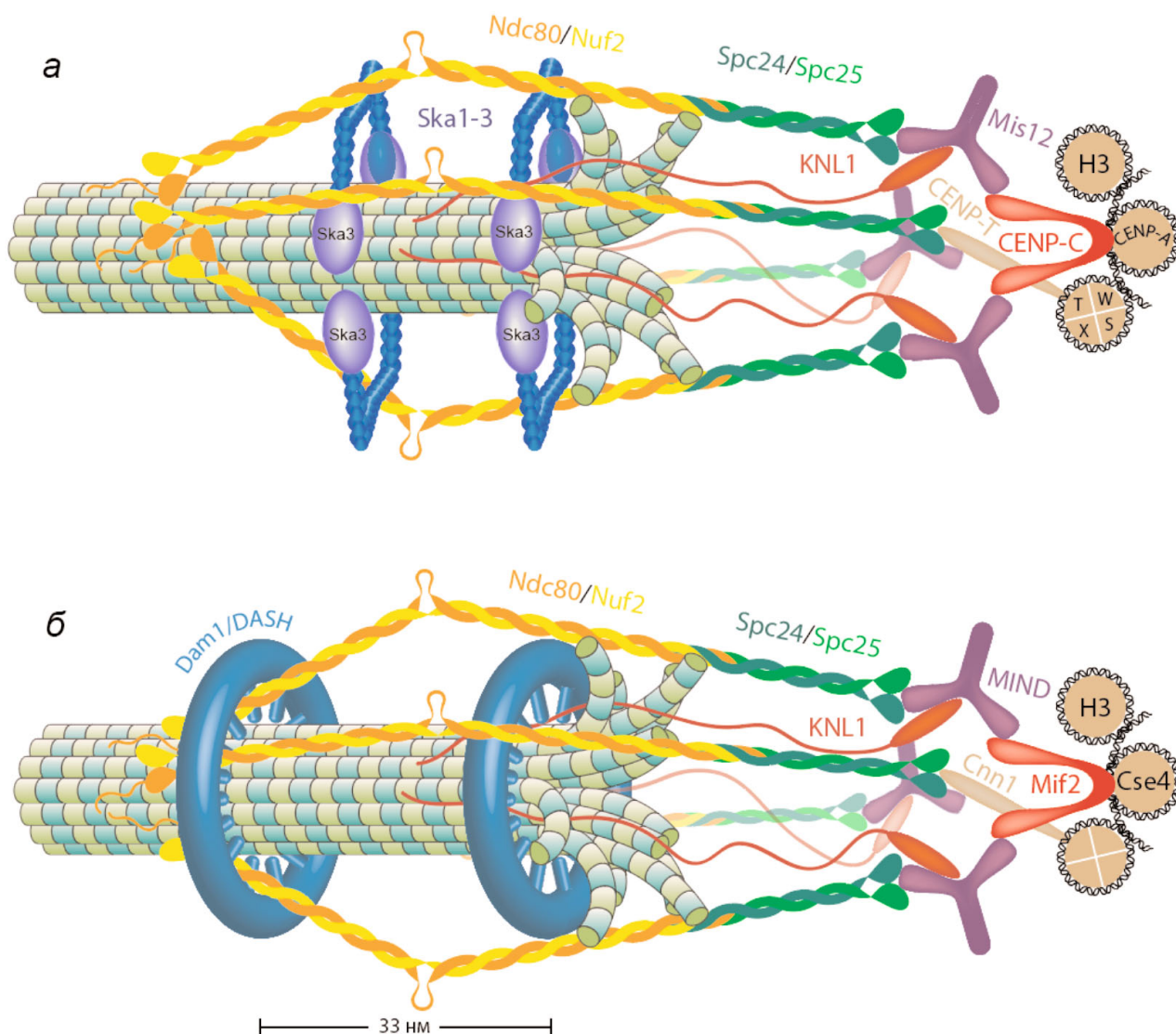


Рис. 4. Взаимодействие комплекса NDC80 с микротрубочками и белками кинетохора (схема): *а* — у высших эукариот; *б* — в почкующихся дрожжах (*S. cerevisiae*). Названия белков кинетохора подписаны на иллюстрации. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

компенсирующих или дополнительных механизмах связывания NDC80 с кинетохором. И действительно, у эукариот присутствует второй кинетохорный рецептор NDC80, который у человека называется CENP-T, а у дрожжей — Cnn1 [29, 61, 62] (рис. 4, *а*, *б*). Известно, что белок Cnn1 (CENP-T) связывается с NDC80 в таком же сайте, что и Dsn1-субъединица MIND-комплекса [29].

Распределение NDC80 между двумя кинетохорными рецепторами в клеточном цикле регулируется циклин-зависимыми (CDK), Aurora- и некоторыми другими киназами [29, 58]. Так, у *S. cerevisiae* замена в Cnn1 всех 16 известных сайтов фосфорилирования на остатки аланина (16A-Cnn1) резко увеличивает сродство этого

белка к NDC80 [29]. В результате мутантный белок 16A-Cnn1, в отличие от своего прототипа, начинает конкурировать с MIND-комплексом еще до сборки метафазной пластинки, когда связыванию нативного Cnn1 с NDC80 препятствует высокая активность митотических киназ Cdk1 и Mps1 [29, 63]. Из-за такого фальстарта NDC80/MIND-комплексы не успевают образоваться в нужном количестве к моменту сборки митотического веретена, что порождает хромосомные дефекты в 16A-Cnn1-продуцирующих дрожжевых клетках — в частности, неравномерное расхождение сестринских хроматид [29]. В отсутствие Cnn1 ($\Delta cnn1$) схожие дефекты проявляются ощутимо слабее [61, 62]. Поначалу считалось, что весь NDC80, который дополнитель-

но садится на кинетохор в анафазе ($\geq 50\%$ от уже связавшегося ранее) [64], присоединяется именно к Cnn1 [61, 62]. Однако ни делеция, ни регуляция (16A-Cnn1) этого белка, как выяснилось впоследствии, никак не влияют на постметафазную локализацию NDC80 [64], что ставит под вопрос значимость Cnn1 для сборки полноценного кинетохора в анафазе.

Впрочем, при дерегуляции основного рецептора MIND у *S. cerevisiae* Cnn1-зависимый путь посадки может стать решающим [65]. Так, тройная аланиновая замена в сайтах фосфорилирования Dsn1 субъединицы комплекса MIND киназами Ipl1- и Cdk1 сама по себе не снижает количество ассоциированных с кинетохором комплексов NDC80 [66], однако в сочетании с делецией $\Delta cnn1$ приводит к гибели дрожжевых клеток [65].

В человеческих клетках фосфорилирование CENP-T не препятствует, как у *S. cerevisiae*, а, напротив, способствует ранней посадке NDC80 на этот кинетохорный рецептор. Связывание происходит еще в G2-фазе клеточного цикла и длится до полного расхождения сестринских хроматид, несмотря на инактивацию CDK в анафазе, что указывает на возможный вклад дополнительных факторов в стабилизацию CENP-T/NDC80-комплексов после дефосфорилирования CENP-T [58]. Таким образом, у человека, в отличие от почкующихся дрожжей, контактов с CENP-C(Mif2)/Mis12(MIND) не хватает для первичной локализации NDC80 на кинетохоре. Это дополнительно подтверждается тем, что количество кинетохор-ассоциированного NDC80 снижается при нокауте CENP-T ~ в 3 раза [15]. Более того, на эктопических кинетохорах, которые собираются на неоцентримерных последовательностях без участия CENP-A (варианта гистона H3), в отсутствие CENP-T локализуется ~10% NDC80 от нормы [58].

Сборка внешнего кинетохора характеризуется устойчивой стехиометрией. Показано, что *in vitro* CENP-C, Mis12 и NDC80 связываются в соотношении 1 : 1 : 1, зато на каждую молекулу фосфорилированного CENP-T садится три молекулы NDC80 — две в свободном виде и еще одна при участии всё того же Mis12. Фосфорилирование Cdk1-киназой остатков T11 и T85 в CENP-T отвечает за непосредственное, а остатка S201 — за Mis12-зависимое связывание NDC80 [67]. Подсчитано, что в HeLa-клетках на каждую молекулу CENP-C и CENP-T в среднем приходится ~ 0,4 и 2,0–2,2 ассоциированных молекул NDC80 соответственно [15]. Значимые отклонения от целочисленных стехиометрических соотношений, по всей вероятности, связаны с различиями в профилях фосфорилирова-

ния *in vitro* и *in vivo* и/или с частичным вытеснением NDC80 другими белками — в частности, HP1- α [55], — из комплекса с Mis12.

Медиаторы взаимодействия NDC80 с микротрубочками. NDC80 при взаимодействии с микротрубочками не обходится без партнеров, посредников и модуляторов из числа других кинетохорных белков. Некоторые из них и сами обладают способностью связываться с микротрубочками. К таким белкам, в частности, долгое время относили KNL1 (Spcl05 у *S. cerevisiae*) — третий компонент KMN-сети наряду с NDC80 и MIND (Mis12) [11, 68, 69] (рис. 4, а, б). Как и NDC80-комплекс, KNL1 присоединяется к (+)-концам микротрубочек — во всяком случае, *in vitro* [11, 70]. KNL1 (Spcl05) отчасти дублирует и смежные функции NDC80, упорядочивая белок-белковые взаимодействия внутри кинетохора [68, 69] и участвуя в успешном прохождении контрольной точки сборки веретена деления [70, 71].

Убедительных свидетельств тому, что NDC80 напрямую связывается с KNL1 после своей посадки на кинетохор, не найдено ни у дрожжей [56, 72], ни у человека [55], ни у нематод [11]. KNL1 и NDC80, вероятно, взаимодействуют через посредника, который узнает гибкую петлю NDC80, на что указывает 30–40%-ное снижение количества белков KNL1 на кинетохоре при нокауте NDC80 или частичном удалении этой петли (Ndc80^{A427-452}) [36]. У человека и других высших эукариот таким посредником, видимо, служит гетеротримерный (Ska1, Ska2, Ska3 (RAMA1)) Ska-комплекс [73], взаимодействующий как с NDC80, так и с KNL1 (рис. 4, а). В самом деле, он почти не локализуется на кинетохоре ни в отсутствие NDC80, ни в NDC80^{A427-452}-продуцирующих клетках [36]. Ранее предполагалось, что C-концевой неструктурированный фрагмент Ska3(RAMA1)-субъединицы (а.о. 102–412) узнает гибкую петлю NDC80, хотя, согласно современным представлениям, более вероятный вклад в связывание вносят жесткие участки фибриллярного стержня [74, 75]. Подобно самому NDC80, Ska-комплекс присоединяется к микротрубочкам *in vitro* [73, 76, 77] и *in vivo* [76, 77], а также следует за их деполимеризующимися (+)-концами [76], причем за непосредственное узнавание концов микротрубочки, вероятно, отвечает C-концевой домен Ska1-субъединицы [77], а за кооперативность связывания — Ska3(RAMA1)-субъединица [76]. При этом Ska-комплекс, в отличие от NDC80 [51], связывается не только с прямыми, но и с изогнутыми протофиламентами на (+)-концах микротрубочки [76, 77]. NDC80- и Ska-комплексы не связываются друг с другом в растворе, однако проявля-

ют синергию при взаимодействии с микротрубочками *in vitro* [74, 76]. Так, человеческий комплекс NDC80-«Broccoli», лишенный C-концевых доменов, повышает сродство Ska к микротрубочке до 5 раз, а полноразмерный NDC80 из *C. elegans* — вдвое. В отсутствие Ska связывание NDC80 с микротрубочками ухудшается почти в 40 раз [76]. Примечательно, что Ska-комплекс частично компенсирует удаление (Δ 80-NDC80) или дерегуляцию (9D-NDC80) N-концевого «хвоста» Hec1 [74,75]. Так, при внесении 9D-замены в аминокислотную последовательность N-конца белка Ndc80, сила отрыва комплекса NDC80 от микротрубочки уменьшается примерно на порядок, но добавление Ska вновь повышает ее в 5–6 раз [74]. Результирующий эффект такой замены *in vivo* должен состоять в двукратном ослаблении контактов между микротрубочкой и кинетохором, что интуитивно согласуется с уменьшением доли кинетохоров, прикрепленных хотя бы к одной микротрубочке, с 80% до 20% [42].

У дрожжей и других грибов ортологов Ska-комплекса не найдено; вместо него схожие функции выполняет Dam1/DASH-комплекс, включающий у *S. cerevisiae* 10 различных белков (Duo1, Dam1, Ask1, Spc19, Spc34, Hsk3 и Dad1-4) [78]. За присоединение этого комплекса к микротрубочке в основном отвечает Dam1-субъединица, о чем можно судить по сопоставимым значениям K_d для нее и цельного гетеродекамера [79]. В присутствии полимеризованного тубулина Dam1/DASH-комплекс олигомеризуется, по разным данным, с образованием 16-, 17- или, что менее вероятно, 25-членных замкнутых колец (реже — спаренных спиралей) вокруг микротрубочки [79–81] (рис. 4, б). При разборке микротрубочек Dam1/DASH-кольца следуют за их деполимеризующимися (+)-концами [82–84]. Аналогичное поведение демонстрируют и некольцевые структуры [83, 85], которыми Dam1/DASH-комплекс представлен у *S. cerevisiae* более чем наполовину [81]. Dam1/DASH-комплекс умеренно взаимодействует с NDC80 в экспериментах *in vitro* уже в растворе, где присутствует в основном в виде димеров [86]. Посадку NDC80 на микротрубочку улучшают и эти димеры, и незамкнутые олигомеры большей массы, и тем более кольцевые структуры [86,87], которые образуются при концентрациях ≥ 1 нМ в пересчете на мономерные единицы [86]. Уже при 500 пМ Dam1/DASH-комплекса диффузия NDC80 по поверхности микротрубочки замедляется как минимум в 5 раз, а скорость его диссоциации обратно в раствор — вдвое [86]. Dam1/DASH-кольца позволяют NDC80 не только в большем количестве присоединяться к

стенкам микротрубочек [87], но и процессивно следовать за их (+)-концами [84, 86], к чему NDC80 не способен без искусственной олигомеризации [88]. Поливалентные NDC80-кластеры в присутствии Dam1/DASH-комплекса более эффективно преобразуют энергию деполимеризации микротрубочки в движение хромосом *in vitro* и грузов *in vivo* [86, 89]. Так, микросферы, покрытые NDC80, при добавлении Dam1/DASH следуют за (+)-концами микротрубочек в 3 раза дольше, а соответствующая скорость отрыва уменьшается в 5 раз [86]. Dam1/DASH-комплексы, искусственно лишенные способности к олигомеризации, также усиливают взаимодействие NDC80 с микротрубочками, но не настолько, чтобы обеспечить контактам микротрубочек и кинетохоров прочность, необходимую для расхождения сестринских хроматид [89]. Таким образом, Dam1/DASH-кольца служат для NDC80 таким же фактором процессивности, как, например, белки скользящего зажима для репликативных ДНК-полимераз [90], а динактин — для моторного белка динеина [91]. Со стороны Dam1/DASH-комплекса в связывании с NDC80 участвуют C-концевые домены субъединиц Dam1, Ask1 и Spc34, каждому из которых соответствует своя область на поверхности NDC80 [87, 92, 93]. Dam1 узнает шпильку α -спиралей между кальпонин-гомологичным доменом Ndc80-субъединицы и фибриллярным стержнем [87, 93], а Ask1 и Spc34 — участки стержня по разные стороны от гибкой петли [93]. Сама эта петля не участвует в связывании с Dam1/DASH, хотя ее частичные делеции нарушают взаимодействие комплексов *in vivo* и друг с другом, и с (+)-концами микротрубочек [38]. Предположительно, дефектные молекулы NDC80, лишенные гибкой петли, не могут должным образом изогнуться, чтобы образовать контакты с Dam1- и Ask1-субъединицами одного и Spc34-субъединицей другого Dam1/DASH-кольца. Интересно наблюдение *in vitro*, что такие кольца часто формируются на микротрубочках парами, причем не только при насыщающих [80], но и при физиологических концентрациях Dam1/DASH-комплекса [93]. Без добавления NDC80-комплекса расстояние между Dam1/DASH-кольцами в таких дублетах, как правило, составляет ~ 13 нм, а в присутствии NDC80 оно возрастает до ≈ 33 нм. При искусственном удлинении стержня NDC80-комплекса на 10 гептадных повторов (NDC80^{10hep}) это расстояние увеличивается еще на 9 нм, что позволяет предположить. Это NDC80 образует критически важные мостиковые контакты между соседними Dam1/DASH-кольцами. В согласии с этим мутации во всех трех NDC80-связываю-

ших участках Dam1/ DASH-комплекса приводят к серьезным дефектам во взаимодействии микротрубочек и хромосом в митозе [93]. Интересно, однако, что (по данным криотомографии) такие мостики, если и образуются, то довольно редко и в основном при участии незамкнутых Dam1/DASH-колец [81].

Аналогично Ska-комплексу у высших эукариот взаимодействие NDC80 с дрожжевым Dam1/DASH-комплексом, как и с (+)-концами микротрубочек, регулируется Ipl1-киназой по 6 сайтам фосфорилирования, 4 из которых сосредоточены в Dam1-субъединице [84–86, 92, 93]. Фосфатные группы либо фосфомиметические замены в большинстве из этих позиций ослабляют взаимодействие Dam1/DASH с (+)-концами микротрубочек [84, 86] и с NDC80 [92] *in vitro*, а также дестабилизируют контакты микротрубочек и кинетохоров *in vivo* [53, 92]. Беззрядные замены в тех же положениях, напротив, укрепляют эти взаимодействия, однако препятствуют исправлению aberrантных прикреплений микротрубочек к кинетохорам с помощью киназы Ipl1 (дрожжевого варианта киназы Aurora B) [92]. Все эти эффекты усиливаются, если какому-то из описанных типов мутаций в Dam1/DASH-комплексе сопутствуют аналогичные мутации в N-концевом «хвосте» NDC80. (См. раздел «Роль N-концевого «хвоста» Hec1(Ndc80) в регуляции аффинности взаимодействия с микротрубочками».)

В почкующихся дрожжах одного Dam1/DASH-комплекса, по-видимому, достаточно, чтобы придать необходимую прочность контактам NDC80 с микротрубочками. Однако у некоторых других эукариот прикрепление микротрубочек к кинетохорам дополнительно стабилизируются за счет белков, напрямую узнающих гибкую петлю NDC80 [34, 35, 37]. Среди них известны белок Dis1 и белковый комплекс Alp7/Alp14 у *S. pombe* [34, 37], а также фактор ДНК-репликации Cdt1 у человека [35]. Предполагается, что Dis1, соединяющий петлю NDC80 с (+)-концом микротрубочки, возмещает дефицит Dam1/DASH-комплекса, которого у делящихся дрожжей не хватает для сборки полностью замкнутых колец [34]. В самом деле, нокаут Dis1 ($\Delta dis1$), удаление гибкой петли в NDC80 (Ndc80 $\Delta 400-476$) либо мутация L405P внутри нее приводит к коллапсу веретена и остановке митоза [34]. Alp7/Alp14-комплекс присоединяется к NDC80 независимо от Dis1. Мутация F420S в гибкой петле NDC80 препятствует локализации Alp7/Alp14 на NDC80, однако, в отличие от Dis1, почти не нарушает морфологию веретена, хотя и дезорганизует расхождение хромосом из-за предполагаемого ослабления кон-

цевых контактов микротрубочек и кинетохоров [37]. Этот же комплекс служит платформой для прикрепления регуляторных и моторных белков — в частности, фосфатазы PP1 и кинезина-8 (Klp5-Klp6 у *S. pombe*), которые участвуют в прохождении контрольной точки сборки веретена деления и ускоряют деполимеризацию микротрубочек в анафазе, соответственно [94]. Достоверно не ясно, узнают ли человеческие гомологи Dis1(Alp14) и Alp7 — ch-TOG и TACC соответственно — именно гибкую петлю NDC80. Как бы то ни было, ch-TOG связывает NDC80 *in vitro*, а также упрочняет контакты микротрубочек и кинетохоров и пролонгирует время жизни этих контактов *in vivo* [95]. В то же время белок Cdt1, ранее известный как лицензирующий фактор ДНК-репликации, связывается у *H. sapiens* как раз с петлей NDC80. Действительно, после ее удаления (Ndc80 $\Delta 420-460$) Cdt1 уже не локализуется на кинетохоре [35]. Обладая значительным сродством еще и к микротрубочке, Cdt1 кооперирует с NDC80 подобно Ska-комплексу, причем вклад данного белка в прочность контактов между кинетохорами и микротрубочками негативно регулируется Aurora B-киназой по 10 предполагаемым сайтам фосфорилирования [96].

ВОЗМОЖНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КОМПЛЕКСА NDC80 С ОНКОГЕНЕЗОМ

Известно, что гиперэкспрессия генов всего комплекса NDC80 или его отдельных субъединиц наблюдается при злокачественных опухолях различной локализации [18–22], зачастую сопутствуя неблагоприятному прогнозу [20, 22]. Индуцированная гиперактивация гена *Hec1* также провоцирует [97], а нокаун, напротив, подавляет рост раковых клеток в мышинной модели [98]. Относительно недавно была высказана пока не доказанная гипотеза, согласно которой NDC80 может служить триггером онкогенеза за счет своей гибкой петли [99]. А именно, в соответствии с этим дискуссионным предположением, избыточные или «лишние» молекулы комплекса NDC80 не локализуются на кинетохоре, а оказываются в цитоплазме, где связывают (секвестрируют) подтвержденные (Cdt1) и предполагаемые (ch-TOG, TACC, Ska) лиганды петли вместе с партнерами по связыванию (кинезином-8 и т. д.), препятствуя участию тех и других в регуляции контактов микротрубочек и кинетохоров и провоцируя хромосомные дефекты в дочерних клетках. Следом дерегулируется экспрессия генов секвестрирован-

ных белков, что только подстегивает дальнейшее размножение анеуплоидных клеток, некоторые из которых рано или поздно перерождаются в раковые.

Действительно, в опухолях, где высока экспрессия генов NDC80, зачастую повышается и уровень вышеупомянутых белков, ассоциированных с микротрубочками [100–102]. То же касается некоторых других белков, которые связываются не с петлей NDC80, а с другими структурными элементами комплекса [97, 103]. В частности, компоненты (Mad1, Mad2) и регуляторы (Mps1, Nek2) контрольной точки сборки веретена деления, которые обеспечивают своевременный переход клетки из метафазы в анафазу, также вырабатываются в опухолевых тканях в повышенном количестве. Так, гиперэкспрессируются ген Mps1-киназы, которая узнает свободные кальпонин-гомологичные домены Ndc80-субъединиц и активирует контрольную точку сборки веретена деления, как и гены самого комплекса NDC80 [22] при колоректальном раке [103]. Задержка анафазы, связанная с гиперэкспрессией гена киназы Mps1 и сопутствующей гиперактивацией контрольной точки, столь же чревата онкогенными хромосомными дефектами, что и мислокализация белков, ассоциированных с микротрубочками [97, 104]. Известно, что NDC80, будучи в избытке, связывает больше Mad1 и Mad2, чем требуется для корректного прохождения контрольной точки [97]. Что же касается Mps1- и Nek2-киназ, то пока неизвестно, гиперэкспрессируются ли их гены сами по себе или уже вслед за повышением экспрессии генов NDC80.

Таким образом, вопрос о том, повышается ли уровень экспрессии генов комплекса NDC80 в клинических случаях возникновения злокачественных новообразований еще до того, как они становятся анеуплоидными, или уже в ответ на хромосомные нарушения, возникновение которых не связано с NDC80, остается открытым. Вполне возможно, что оба этих сценария на практике почти никогда не реализуются и гиперэкспрессия генов NDC80 служит не первопричиной и не следствием рака, а скорее промежуточным триггером при переходе опухоли из умеренного в агрессивный режим роста.

Митотическое деление венчает собой жизненный цикл любой эукариотической клетки вне зависимости от того, является ли она частью многоклеточного организма или самодостаточным целым. В митозе участвуют десятки белковых комплексов, одни из которых напрямую

осуществляют контакты между кинетохором и микротрубочкой, другие регулируют прочность этих контактов, а третьи — синхронизируют сборку и разборку микротрубочек со своевременным переключением между фазами деления. Комплекс NDC80 вносит вклад во все эти процессы, играя роль своеобразного регуляторного хаба. В связи с этим, не удивительно, что деление клеток оказывается чувствительным не только к мутациям в NDC80, но и к уровню экспрессии генов этого комплекса. Действительно, патологической пролиферации опухолевых клеток, которая не обходится без тех или иных сбоя в аппарате деления, зачастую сопутствует повышенная выработка NDC80.

Можно предположить, что направленная блокировка NDC80 может оказаться перспективной в терапии злокачественных новообразований. Ассортимент известных малых молекул, способных каким-то образом модулировать работу NDC80 комплекса, пока ограничивается лишь несколькими соединениями, одно из которых, вероятно, препятствует посадке NDC80 на микротрубочку, связываясь с тубулином [105], а остальные — ингибируют взаимодействие комплекса NDC80 с Nek2-киназой [106–109]. Как и ожидалось, все эти вещества в той или иной степени подавляют рост целого ряда опухолей *in vitro* и/или *in vivo* [106–109]. Подбор блокаторов не к тубулину, а напрямую к NDC80 в будущем, возможно, обеспечит не только высокую эффективность остановки клеточного деления, но и меньшее количество негативных побочных воздействий на организм по сравнению с существующими препаратами. Последние подавляют динамику не только митотических, но и, например, аксональных микротрубочек, тем самым провоцируя нейродегенеративные эффекты [110]. Прямые ингибиторы функций NDC80 обещают быть избавленными от этой проблемы и помочь в борьбе со злокачественными новообразованиями с меньшими отрицательными последствиями для нервной системы и организма человека в целом.

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов.

Благодарности. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект 17-74-20152).

Соблюдение этических норм. Данная работа не содержит исследований, в которых были бы использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Petry, S. (2016) Mechanisms of mitotic spindle assembly, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 659-683, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014528.
- Miki-Nomura, T., and Mori, H. (1972) Polymerization of tubulin: the linear polymer and its side-by-side aggregates, *J. Mechanochem. Cell. Motil.*, **1**, 175-188, doi: 10.1038/331499a0.
- Bergen, L. G., and Borisy, G. G. (1980) Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly, *J. Cell Biol.*, **84**, 141-150, doi: 10.1083/jcb.84.1.141.
- Huitorel, P., and Kirschner, M. W. (1988) The polarity and stability of microtubule capture by the kinetochore, *J. Cell Biol.*, **106**, 151-159, doi: 10.1083/jcb.106.1.151.
- Koshland, D. E., Mitchison, T. J., and Kirschner, M. W. (1988) Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization *in vitro*, *Nature*, **331**, 499-504.
- Mitchison, T. J., and Kirschner, M. W. (1985) Properties of the kinetochore *in vitro*. I. Microtubule nucleation and tubulin binding, *J. Cell Biol.*, **101**, 755-765, doi: 10.1083/jcb.101.3.755.
- McAinsh, A. D., Tytell, J. D., and Sorger, P. K. (2003) Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 519-539, doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155607.
- Westermann, S., Drubin, D. G., and Barnes, G. (2007) Structures and functions of yeast kinetochore complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 563-591, doi: 10.1146/annurev-biochem.76.052705.160607.
- Cheeseman, I. M., and Desai, A. (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 33-46, doi: 10.1038/nrm2310.
- Welburn, J. P. I., and Cheeseman, I. M. (2008) Toward a molecular structure of the eukaryotic kinetochore, *Dev. Cell*, **15**, 645-655, doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.011.
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M., and Desai, A. (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore, *Cell*, **127**, 983-997, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.039.
- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C., and Schiebel, E. (2001) The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control, *EMBO J.*, **20**, 777-791, doi: 10.1093/emboj/20.4.777.
- Joglekar, A. P., Bouck, D. C., Molk, J. N., Bloom, K. S., and Salmon, E. D. (2006) Molecular architecture of a kinetochore-microtubule attachment site, *Nat. Cell Biol.*, **8**, 581-585, doi: 10.1038/ncb1414.
- Aravamudan, P., Felzer-Kim, I., Gurunathan, K., and Joglekar, A. P. (2014) Assembling the protein architecture of the budding yeast kinetochore-microtubule attachment using FRET, *Curr. Biol.*, **24**, 1437-1446, doi: 10.1016/j.cub.2014.05.014.
- Suzuki, A., Badger, B. L., and Salmon, E. D. (2015) A quantitative description of Ndc80 complex linkage to human kinetochores, *Nat. Commun.*, **6**, 8161, doi: 10.1038/ncomms9161.
- Lawrimore, J., Bloom, K. S., and Salmon, E. D. (2011) Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome, *J. Cell Biol.*, **195**, 573-582, doi: 10.1083/jcb.201106036.
- Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004) The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer, *Oncogene*, **23**, 2016-2027, doi: 10.1038/sj.onc.1207374.
- Qu, Y., Li, J., Cai, Q., and Liu, B. (2014) Hec1/Ndc80 is overexpressed in human gastric cancer and regulates cell growth, *J. Gastroenterol.*, **49**, 408-418, doi: 10.1007/s00535-013-0809-y.
- Hu, P., Chen, X., Sun, J., Bie, P., and Zhang, L.-D. (2015) siRNA-mediated knockdown against NUF2 suppresses pancreatic cancer proliferation *in vitro* and *in vivo*, *Biosci. Rep.*, **35**, doi: 10.1042/BSR20140124.
- Meng, Q.-C., Wang, H.-C., Song, Z.-L., Shan, Z.-Z., Yuan, Z., Zheng, Q., and Huang, X.-Y. (2015) Overexpression of NDC80 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and regulates cell proliferation, *Am. J. Cancer Res.*, **5**, 1730-1740.
- Wang, H., Gao, X., Lu, X., Wang, Y., Ma, C., Shi, Z., Zhu, F., He, B., Xu, C., and Sun, Y. (2015) The mitotic regulator Hec1 is a critical modulator of prostate cancer through the long non-coding RNA BX647187 *in vitro*, *Biosci. Rep.*, **35**, doi: 10.1042/BSR20150003.
- Yan, X., Huang, L., Liu, L., Qin, H., and Song, Z. (2018) Nuclear division cycle 80 promotes malignant progression and predicts clinical outcome in colorectal cancer, *Cancer Med.*, **7**, 420-432, doi: 10.1002/cam4.1284.
- Wei, R. R., Sorger, P. K., and Harrison, S. C. (2005) Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5363-5367, doi: 10.1073/pnas.0501168102.
- DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2006) Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1, *Cell*, **127**, 969-982, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.047.
- Wei, R. R., Al-Bassam, J., and Harrison, S. C. (2007) The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 54-59, doi: 10.1038/nsmb1186.
- Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J. G., and De Wulf, P. et al. (2008) Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex, *Cell*, **133**, 427-439, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.020.
- Sundin, L. J. R., Guimaraes, G. J., and Deluca, J. G. (2011) The NDC80 complex proteins Nuf2 and Hec1 make distinct contributions to kinetochore-microtubule attachment in mitosis, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 759-768, doi: 10.1091/mbc.E10-08-0671.
- McClelland, M. L., Kallio, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Kestner, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Gorbisky, G. J., and Stukenberg, P. T. (2004) The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment, *Curr. Biol.*, **14**, 131-137, doi: 10.1016/j.cub.2003.12.058.
- Malvezzi, F., Litos, G., Schleiffer, A., Heuck, A., Mechtler, K., Clausen, T., and Westermann, S. (2013) A structural basis for kinetochore recruitment of the Ndc80 complex *via* two distinct centromere receptors, *EMBO J.*, **32**, 409-423, doi: 10.1038/emboj.2012.356.
- Wei, R. R., Schnell, J. R., Larsen, N. A., Sorger, P. K., Chou, J. J., and Harrison, S. C. (2006) Structure of a central component of the yeast kinetochore: the Spc24p/Spc25p globular domain, *Structure*, **14**, 1003-1009, doi: 10.1016/j.str.2006.04.007.
- Valverde, R., Ingram, J., and Harrison, S. C. (2016) Conserved tetramer junction in the kinetochore Ndc80 complex, *Cell Rep.*, **17**, 1915-1922, doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.065.
- Mustyatsa, V. V., Boyakhchyan, A. V., Ataullakhanov, F. I., and Gudimchuk, N. B. (2017) EB-family proteins: functions and microtubule interaction mechanisms, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 791-802, doi: 10.1134/S0006297917070045.
- Wang, H.-W., Long, S., Ciferri, C., Westermann, S., Drubin, D., Barnes, G., and Nogales, E. (2008) Architecture and flexibility of the yeast Ndc80 kinetochore

- complex, *J. Mol. Biol.*, **383**, 894-903, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.077.
34. Hsu, K.-S., and Toda, T. (2011) Ndc80 internal loop interacts with Dis1/TOG to ensure proper kinetochore-spindle attachment in fission yeast, *Curr. Biol.*, **21**, 214-220, doi: 10.1016/j.cub.2010.12.048.
 35. Varma, D., Chandrasekaran, S., Sundin, L. J. R., Reidy, K. T., Wan, X., Chasse, D. A. D., Nevis, K. R., DeLuca, J. G., Salmon, E. D., and Cook, J. G. (2012) Recruitment of the human Cdt1 replication licensing protein by the loop domain of Hec1 is required for stable kinetochore-microtubule attachment, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 593-603, doi: 10.1038/ncb2489.
 36. Zhang, G., Kelstrup, C. D., Hu, X.-W., Kaas Hansen, M. J., Singleton, M. R., Olsen, J. V., and Nilsson, J. (2012) The Ndc80 internal loop is required for recruitment of the Ska complex to establish end-on microtubule attachment to kinetochores, *J. Cell. Sci.*, **125**, 3243-3253, doi: 10.1242/jcs.104208.
 37. Tang, N. H., Takada, H., Hsu, K.-S., and Toda, T. (2013) The internal loop of fission yeast Ndc80 binds Alp7/TACC-Alp14/TOG and ensures proper chromosome attachment, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1122-1133, doi: 10.1091/mbc.E12-11-0817.
 38. Maure, J.-F., Komoto, S., Oku, Y., Mino, A., Pasqualato, S., Natsume, K., Clayton, L., Musacchio, A., and Tanaka, T. U. (2011) The Ndc80 loop region facilitates formation of kinetochore attachment to the dynamic microtubule plus end, *Curr. Biol.*, **21**, 207-213, doi: 10.1016/j.cub.2010.12.050.
 39. Joglekar, A. P., Bloom, K., and Salmon, E. D. (2009) *In vivo* protein architecture of the eukaryotic kinetochore with nanometer scale accuracy, *Curr. Biol.*, **19**, 694-699, doi: 10.1016/j.cub.2009.02.056.
 40. Scarborough, E. A., Davis, T. N., and Asbury, C. L. (2019) Tight bending of the Ndc80 complex provides intrinsic regulation of its binding to microtubules, *Elife*, **8**, doi: 10.7554/eLife.44489.
 41. Tien, J. F., Umbreit, N. T., Zelter, A., Riffle, M., Hoopmann, M. R., Johnson, R. S., Fonslow, B. R., Yates, J. R., MacCoss, M. J., and Moritz, R. L. et al. (2014) Kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a tightly folded conformation of the Ndc80 complex, *Genetics*, **198**, 1483-1493, doi: 10.1534/genetics.114.167775.
 42. Guimaraes, G. J., Dong, Y., McEwen, B. F., and DeLuca, J. G. (2008) Kinetochore-microtubule attachment relies on the disordered N-terminal tail domain of Hec1, *Curr. Biol.*, **18**, 1778-1784, doi: 10.1016/j.cub.2008.08.012.
 43. Miller, S. A., Johnson, M. L., and Stukenberg, P. T. (2008) Kinetochore attachments require an interaction between unstructured tails on microtubules and Ndc80(Hec1), *Curr. Biol.*, **18**, 1785-1791, doi: 10.1016/j.cub.2008.11.007.
 44. Malik, R., Lenobel, R., Santamaria, A., Ries, A., Nigg, E. A., and Körner, R. (2009) Quantitative analysis of the human spindle phosphoproteome at distinct mitotic stages, *J. Proteome Res.*, **8**, 4553-4563, doi: 10.1021/pr9003773.
 45. DeLuca, K. F., Meppelink, A., Broad, A. J., Mick, J. E., Peersen, O. B., Pektas, S., Lens, S. M. A., and DeLuca, J. G. (2018) Aurora A kinase phosphorylates Hec1 to regulate metaphase kinetochore-microtubule dynamics, *J. Cell Biol.*, **217**, 163-177, doi: 10.1083/jcb.201707160.
 46. DeLuca, K. F., Lens, S. M. A., and DeLuca, J. G. (2011) Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis, *J. Cell. Sci.*, **124**, 622-634, doi: 10.1242/jcs.072629.
 47. Biggins, S., Severin, F. F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A. A., and Murray, A. W. (1999) The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast, *Genes Dev.*, **13**, 532-544, doi: 10.1101/gad.13.5.532.
 48. Liu, D., Vleugel, M., Backer, C. B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I. M., and Lampson, M. A. (2010) Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase, *J. Cell Biol.*, **188**, 809-820, doi: 10.1083/jcb.201001006.
 49. Zaytsev, A. V., Sundin, L. J. R., DeLuca, K. F., Grishchuk, E. L., and DeLuca, J. G. (2014) Accurate phosphoregulation of kinetochore-microtubule affinity requires unconstrained molecular interactions, *J. Cell Biol.*, **206**, 45-59, doi: 10.1083/jcb.201312107.
 50. Yoo, T. Y., Choi, J.-M., Conway, W., Yu, C.-H., Pappu, R. V., and Needleman, D. J. (2018) Measuring NDC80 binding reveals the molecular basis of tension-dependent kinetochore-microtubule attachments, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.36392.
 51. Alushin, G. M., Ramey, V. H., Pasqualato, S., Ball, D. A., Grigorieff, N., Musacchio, A., and Nogales, E. (2010) The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules, *Nature*, **467**, 805-810, doi: 10.1038/nature09423.
 52. Alushin, G. M., Musinipally, V., Matson, D., Tooley, J., Stukenberg, P. T., and Nogales, E. (2012) Multimodal microtubule binding by the Ndc80 kinetochore complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1161-1167, doi: 10.1038/nsmb.2411.
 53. Sarangapani, K. K., Akiyoshi, B., Duggan, N. M., Biggins, S., and Asbury, C. L. (2013) Phosphoregulation promotes release of kinetochores from dynamic microtubules via multiple mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7282-7287, doi: 10.1073/pnas.1220700110.
 54. Zaytsev, A. V., Mick, J. E., Maslennikov, E., Nikashin, B., DeLuca, J. G., and Grishchuk, E. L. (2015) Multisite phosphorylation of the NDC80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity, *Mol. Biol. Cell*, **26**, 1829-1844, doi: 10.1091/mbc.E14-11-1539.
 55. Petrovic, A., Pasqualato, S., Dube, P., Krenn, V., Santaguida, S., Cittaro, D., Monzani, S., Massimiliano, L., Keller, J., and Tarricone, A. et al. (2010) The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly, *J. Cell Biol.*, **190**, 835-852, doi: 10.1083/jcb.201002070.
 56. Maskell, D. P., Hu, X.-W., and Singleton, M. R. (2010) Molecular architecture and assembly of the yeast kinetochore MIND complex, *J. Cell Biol.*, **190**, 823-834, doi: 10.1083/jcb.201002059.
 57. Screpanti, E., De Antoni, A., Alushin, G. M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E., and Musacchio, A. (2011) Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore, *Curr. Biol.*, **21**, 391-398, doi: 10.1016/j.cub.2010.12.039.
 58. Gascoigne, K. E., Takeuchi, K., Suzuki, A., Hori, T., Fukagawa, T., and Cheeseman, I. M. (2011) Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes, *Cell*, **145**, 410-422, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.031.
 59. Yiap, B. C., Radhakrishnan, A. K., and Varma, N. R. (2008) DSN1 deletion is deleterious to the *Saccharomyces cerevisiae* while Dsn1p disrupts nuclear segregation process of chinese hamster ovary cell, *Afr. J. Biotech.*, **7**, 2315-2320.
 60. Kline, S. L., Cheeseman, I. M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2006) The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation, *J. Cell Biol.*, **173**, 9-17, doi: 10.1083/jcb.200509158.
 61. Schleiffer, A., Maier, M., Litos, G., Lampert, F., Hornung, P., Mechtler, K., and Westermann, S. (2012) CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 604-613, doi: 10.1038/ncb2493.
 62. Bock, L. J., Pagliuca, C., Kobayashi, N., Grove, R. A., Oku, Y., Shrestha, K., Alfieri, C., Golfieri, C., Oldani, A., and Dal Maschio, M. et al. (2012) Cnn1 inhibits the interactions between the KMN complexes of the yeast kinetochore, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 614-624, doi: 10.1038/ncb2495.
 63. Palframan, W. J., Meehl, J. B., Jaspersen, S. L., Winey, M., and Murray, A. W. (2006) Anaphase inactivation of the

- spindle checkpoint, *Science*, **313**, 680-684, doi: 10.1126/science.1127205.
64. Dhatchinamoorthy, K., Shivaraju, M., Lange, J. J., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Slaughter, B. D., and Gerton, J. L. (2017) Structural plasticity of the living kinetochore, *J. Cell Biol.*, **216**, 3551-3570, doi: 10.1083/jcb.201703152.
 65. Lang, J., Barber, A., and Biggins, S. (2018) An assay for de novo kinetochore assembly reveals a key role for the CENP-T pathway in budding yeast, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.37819.
 66. Akiyoshi, B., Nelson, C. R., and Biggins, S. (2013) The aurora B kinase promotes inner and outer kinetochore interactions in budding yeast, *Genetics*, **194**, 785-789, doi: 10.1534/genetics.113.150839.
 67. Huis In 't Veld, P. J., Jeganathan, S., Petrovic, A., Singh, P., John, J., Krenn, V., Weissmann, F., Bange, T., and Musacchio, A. (2016) Molecular basis of outer kinetochore assembly on CENP-T, *Elife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.21007.
 68. Caldas, G. V., and DeLuca, J. G. (2014) KNL1: bringing order to the kinetochore, *Chromosoma*, **123**, 169-181, doi: 10.1007/s00412-013-0446-5.
 69. Ghongane, P., Kapanidou, M., Asghar, A., Elowe, S., and Bolanos-Garcia, V. M. (2014) The dynamic protein Knl1-a kinetochore rendezvous, *J. Cell. Sci.*, **127**, 3415-3423, doi: 10.1242/jcs.149922.
 70. Pagliuca, C., Draviam, V. M., Marco, E., Sorger, P. K., and De Wulf, P. (2009) Roles for the conserved spc105p/kre28p complex in kinetochore-microtubule binding and the spindle assembly checkpoint, *PLoS One*, **4**, e7640, doi: 10.1371/journal.pone.0007640.
 71. Espeut, J., Cheerambathur, D. K., Krenning, L., Oegema, K., and Desai, A. (2012) Microtubule binding by KNL-1 contributes to spindle checkpoint silencing at the kinetochore, *J. Cell Biol.*, **196**, 469-482, doi: 10.1083/jcb.201111107.
 72. Kerres, A., Jakopiec, V., and Fleig, U. (2007) The conserved Spc7 protein is required for spindle integrity and links kinetochore complexes in fission yeast, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2441-2454, doi: 10.1091/mbc.e06-08-0738.
 73. Jeyaprakash, A. A., Santamaria, A., Jayachandran, U., Chan, Y. W., Benda, C., Nigg, E. A., and Conti, E. (2012) Structural and functional organization of the Ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface, *Mol. Cell*, **46**, 274-286, doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.005.
 74. Helgeson, L. A., Zelter, A., Riffle, M., MacCoss, M. J., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2018) Human Ska complex and Ndc80 complex interact to form a load-bearing assembly that strengthens kinetochore-microtubule attachments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2740-2745, doi: 10.1073/pnas.1718553115.
 75. Wimbish, R., DeLuca, K. F., Mick, J. E., Himes, J., Sánchez, I. J., Jeyaprakash, A. A., and DeLuca, J. G. (2019) Coordination of NDC80 and Ska complexes at the kinetochore-microtubule interface in human cells, preprint, *Cell Biol.*, doi: 10.1101/820530.
 76. Schmidt, J. C., Arthanari, H., Boeszoermyenyi, A., Dashkevich, N. M., Wilson-Kubalek, E. M., Monnier, N., Markus, M., Oberer, M., Milligan, R. A., and Bathe, M. et al. (2012) The kinetochore-bound Skal complex tracks depolymerizing microtubules and binds to curved protofilaments, *Dev. Cell*, **23**, 968-980, doi: 10.1016/j.devcel.2012.09.012.
 77. Abad, M. A., Medina, B., Santamaria, A., Zou, J., Plasberg-Hill, C., Madhumalar, A., Jayachandran, U., Redli, P. M., Rappsilber, J., and Nigg, E. A. et al. (2014) Structural basis for microtubule recognition by the human kinetochore Ska complex, *Nat. Commun.*, **5**, 2964, doi: 10.1038/ncomms3964.
 78. Ramey, V. H., Wong, A., Fang, J., Howes, S., Barnes, G., and Nogales, E. (2011) Subunit organization in the Dam1 kinetochore complex and its ring around microtubules, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4335-4342, doi: 10.1091/mbc.E11-07-0659.
 79. Westermann, S., Avila-Sakar, A., Wang, H.-W., Niederstrasser, H., Wong, J., Drubin, D. G., Nogales, E., and Barnes, G. (2005) Formation of a dynamic kinetochore-microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex, *Mol. Cell.*, **17**, 277-290, doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.019.
 80. Miranda, J. J. L., De Wulf, P., Sorger, P. K., and Harrison, S. C. (2005) The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 138-143, doi: 10.1038/nsmb896.
 81. Ng, C. T., Deng, L., Chen, C., Lim, H. H., Shi, J., Surana, U., and Gan, L. (2019) Electron cryotomography analysis of Dam1C/DASH at the kinetochore-spindle interface *in situ*, *J. Cell Biol.*, **218**, 455-473, doi: 10.1083/jcb.201809088.
 82. Westermann, S., Wang, H.-W., Avila-Sakar, A., Drubin, D. G., Nogales, E., and Barnes, G. (2006) The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends, *Nature*, **440**, 565-569, doi: 10.1038/nature04409.
 83. Grishchuk, E. L., Spiridonov, I. S., Volkov, V. A., Efremov, A., Westermann, S., Drubin, D., Barnes, G., Ataulakhanov, F. I., and McIntosh, J. R. (2008) Different assemblies of the DAM1 complex follow shortening microtubules by distinct mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6918-6923, doi: 10.1073/pnas.0801811105.
 84. Lampert, F., Hornung, P., and Westermann, S. (2010) The Dam1 complex confers microtubule plus end-tracking activity to the Ndc80 kinetochore complex, *J. Cell Biol.*, **189**, 641-649, doi: 10.1083/jcb.200912021.
 85. Gestaut, D. R., Graczyk, B., Cooper, J., Widlund, P. O., Zelter, A., Wordeman, L., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2008) Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation, *Nat. Cell Biol.*, **10**, 407-414, doi: 10.1038/ncb1702.
 86. Tien, J. F., Umbreit, N. T., Gestaut, D. R., Franck, A. D., Cooper, J., Wordeman, L., Gonen, T., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2010) Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B, *J. Cell Biol.*, **189**, 713-723, doi: 10.1083/jcb.200910142.
 87. Lampert, F., Mieck, C., Alushin, G. M., Nogales, E., and Westermann, S. (2013) Molecular requirements for the formation of a kinetochore-microtubule interface by Dam1 and Ndc80 complexes, *J. Cell Biol.*, **200**, 21-30, doi: 10.1083/jcb.201210091.
 88. Volkov, V. A., Huis In 't Veld, P. J., Dogterom, M., and Musacchio, A. (2018) Multivalency of NDC80 in the outer kinetochore is essential to track shortening microtubules and generate forces, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.36764.
 89. Umbreit, N. T., Miller, M. P., Tien, J. F., Ortolá, J. C., Gui, L., Lee, K. K., Biggins, S., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2014) Kinetochore require oligomerization of Dam1 complex to maintain microtubule attachments against tension and promote biorientation, *Nat. Commun.*, **5**, 4951, doi: 10.1038/ncomms5951.
 90. Kuriyan, J., and O'Donnell, M. (1993) Sliding clamps of DNA polymerases, *J. Mol. Biol.*, **234**, 915-925, doi: 10.1006/jmbi.1993.1644.
 91. King, S. J., and Schroer, T. A. (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 20-24, doi: 10.1038/71338.
 92. Kalantzaki, M., Kitamura, E., Zhang, T., Mino, A., Novák, B., and Tanaka, T. U. (2015) Kinetochore-microtubule error correction is driven by differentially regulated interaction modes, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 421-433, doi: 10.1038/ncb3128.
 93. Kim, J. O., Zelter, A., Umbreit, N. T., Bollozos, A., Riffle, M., Johnson, R., MacCoss, M. J., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2017) The Ndc80 complex bridges two Dam1 complex rings, *Elife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.21069.
 94. Tang, N. H., and Toda, T. (2015) Alp7/TACC recruits kinesin-8-PP1 to the Ndc80 kinetochore protein for time-

- ly mitotic progression and chromosome movement, *J. Cell. Sci.*, **128**, 354–363, doi: 10.1242/jcs.160036.
95. Miller, M. P., Asbury, C. L., and Biggins, S. (2016) A TOG protein confers tension sensitivity to kinetochore-microtubule attachments, *Cell*, **165**, 1428–1439, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.030.
 96. Agarwal, S., Smith, K. P., Zhou, Y., Suzuki, A., McKenney, R. J., and Varma, D. (2018) Cdt1 stabilizes kinetochore-microtubule attachments via an Aurora B kinase-dependent mechanism, *J. Cell Biol.*, **217**, 3446–3463, doi: 10.1083/jcb.201705127.
 97. Diaz-Rodríguez, E., Sotillo, R., Schvartzman, J.-M., and Benezra, R. (2008) Hec1 overexpression hyperactivates the mitotic checkpoint and induces tumor formation *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16719–16724, doi: 10.1073/pnas.0803504105.
 98. Gurzov, E. N., and Izquierdo, M. (2006) RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth *in vivo*, *Gene Ther.*, **13**, 1–7, doi: 10.1038/sj.gt.3302595.
 99. Tang, N. H., and Toda, T. (2015) MAPping the Ndc80 loop in cancer: A possible link between Ndc80/Hec1 overproduction and cancer formation, *Bioessays*, **37**, 248–256, doi: 10.1002/bies.201400175.
 100. Still, I. H., Vince, P., and Cowell, J. K. (1999) The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines, *Genomics*, **58**, 165–170, doi: 10.1006/geno.1999.5829.
 101. Nagahara, M., Nishida, N., Iwatsuki, M., Ishimaru, S., Mimori, K., Tanaka, F., Nakagawa, T., Sato, T., Sugihara, K., and Hoon, D. S. et al. (2011) Kinesin 18A expression: clinical relevance to colorectal cancer progression, *Int. J. Cancer*, **129**, 2543–2552, doi: 10.1002/ijc.25916.
 102. Karavias, D., Maroulis, I., Papadaki, H., Gogos, C., Kakkos, S., Karavias, D., and Bravou, V. (2016) Overexpression of CDT1 is a predictor of poor survival in patients with hepatocellular carcinoma, *J. Gastrointest. Surg.*, **20**, 568–579, doi: 10.1007/s11605-015-2960-7.
 103. Ling, Y., Zhang, X., Bai, Y., Li, P., Wei, C., Song, T., Zheng, Z., Guan, K., Zhang, Y., Zhang, B. et al. (2014) Overexpression of Mps1 in colon cancer cells attenuates the spindle assembly checkpoint and increases aneuploidy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 1690–1695, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.071.
 104. Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., and Benezra, R. (2007) Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice, *Cancer Cell*, **11**, 9–23, doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.019.
 105. Screpanti, E., Santaguida, S., Nguyen, T., Silvestri, R., Gussio, R., Musacchio, A., Hamel, E., and De Wulf, P. (2010) A screen for kinetochore-microtubule interaction inhibitors identifies novel antitubulin compounds, *PLoS One*, **5**, e11603, doi: 10.1371/journal.pone.0011603.
 106. Wu, G., Qiu, X.-L., Zhou, L., Zhu, J., Chamberlin, R., Lau, J., Chen, P.-L., and Lee, W.-H. (2008) Small molecule targeting the Hec1/Nek2 mitotic pathway suppresses tumor cell growth in culture and in animal, *Cancer Res.*, **68**, 8393–8399, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1915.
 107. Huang, L. Y. L., Lee, Y.-S., Huang, J.-J., Chang, C., Chang, J.-M., Chuang, S.-H., Kao, K.-J., Tsai, Y.-J., Tsai, P.-Y., and Liu, C.-W. et al. (2014) Characterization of the biological activity of a potent small molecule Hec1 inhibitor TAI-1, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **33**, 6, doi: 10.1186/1756-9966-33-6.
 108. Huang, L. Y. L., Chang, C.-C., Lee, Y.-S., Chang, J.-M., Huang, J.-J., Chuang, S.-H., Kao, K.-J., Lau, G. M. G., Tsai, P.-Y., and Liu, C.-W. et al. (2014) Activity of a novel Hec1-targeted anticancer compound against breast cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cancer Ther.*, **13**, 1419–1430, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0700.
 109. Hu, C.-M., Zhu, J., Guo, X. E., Chen, W., Qiu, X.-L., Ngo, B., Chien, R., Wang, Y. V., Tsai, C. Y., and Wu, G. et al. (2015) Novel small molecules disrupting Hec1/Nek2 interaction ablate tumor progression by triggering Nek2 degradation through a death-trap mechanism, *Oncogene*, **34**, 1220–1230, doi: 10.1038/ncr.2014.67.
 110. Carozzi, V. A., Canta, A., and Chiorazzi, A. (2015) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? *Neurosci. Lett.*, **596**, 90–107, doi: 10.1016/j.neulet.2014.10.014.

PROTEIN COMPLEX NDC80: PROPERTIES, FUNCTIONS AND POSSIBLE ROLE IN PATHOPHYSIOLOGY OF CELL DIVISION

Review

N. B. Ustinov¹, A. V. Korshunova^{1,2}, and N. B. Gudimchuk^{1,2*}

¹ Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: gudimchuk@phys.msu.ru

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, 119991 Moscow, Russia

Received January 30, 2020

Revised March 2, 2020

Accepted March 2, 2020

Mitotic division maintains the genetic identity of any multicellular organism throughout a whole lifetime. Each time when a mother cell divides, chromosomes are equally distributed between daughter cells thanks to the action of mitotic spindle apparatus, assembled from microtubules – dynamic polymers of the tubulin protein. Spindle microtubules attach to kinetochores – large multi-protein complexes on chromosomes – in a manner called end-on attachment. This review is devoted to one of the most important kinetochore elements, the four-subunit complex NDC80, which plays a major role in the attachment of assembling and disassembling microtubule ends to chromosomes. Here we systematize literature data about the structure, properties and regulation of the NDC80 complex in cells. In the review, we also trace the possible relationship between misexpression of the genes, coding components of the NDC80 complex, mitotic disorders and oncogenesis, drawing the readers' attention to the diagnostic and therapeutic potential of this protein complex.

Keywords: mitosis, mitotic spindle, microtubules, kinetochore, phosphoregulation, inhibition of mitosis, NDC80, antimitotic drugs

УДК 577.151

СУБСТРАТНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОМОЛОГОВ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ L-ТРЕОНОВОЙ КИСЛОТЫ*,**

© 2020 Ч. Чжан^{1#}, Юй Лю^{1#}, С. У¹, С. Чжан^{2***}, Х. Хуан^{1***}

¹ Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631 China; E-mail: hhuang@m.scnu.edu.cn

² Institute of Ecological Science, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631 China; E-mail: xszhang@scnu.edu.cn

Поступила в редакцию 26.11.2019

После доработки 07.01.2020

Принята к публикации 21.01.2020

Несмотря на физиологическое значение альдоновых сахарных кислот для живых организмов, мало известно о метаболических путях этих соединений. В данной работе мы исследовали функциональное разнообразие гомологов дегидрогеназы L-треоновой кислоты (ThrDH, UniProt ID: Q0KBC7) – фермента, имеющего два NAD-связывающих домена (PF14833 и PF03446). Мы изучили десять гомологов ThrDH с различным геномным контекстом и охарактеризовали семь новых ферментативных активностей ((R)-пантоатдегидрогеназа, L-дегидрогеназа альдроновой кислоты, дегидрогеназа 6-дезоксид-альдроновой кислоты, дегидрогеназа L-идоновой кислоты, дегидрогеназа D-ксилоновой кислоты, дегидрогеназа D-глюконовой кислоты и редуктаза 2-гидроксид-3-оксопантотоевой кислоты). Кроме того, нами также были идентифицированы два ассоциированных метаболических пути: было обнаружено, что дегидрогеназа L-идоновой кислоты участвует в деградации L-идоновой кислоты посредством ее окисления/декарбоксилирования у *Agrobacterium radiobacter* K84, в то время как 2-гидроксид-3-оксопантотредуктаза участвует в катаболизме D-глюкарата посредством дегидрирования/расщепления субстрата у *Ralstonia metallidurans* CH34.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: (R)-пантоатдегидрогеназа, катаболизм L-идоновой кислоты, катаболизм D-глюкарата, дегидрогеназа L-альдроновой кислоты, дегидрогеназа D-ксилоновой кислоты.

DOI: 10.31857/S0320972520040065

Сахарные кислоты представляют собой сахараиды с карбоксильной группой. Их подразделяют на альдоновые, улозоновые, уроновые и альдаровые кислоты. Альдоновые кислоты, у которых альдегидная функциональная группа альдозы окислена с образованием карбоксильной группы, выполняют важные физиологические функции. Например, D-глюконовая кислота является регулятором кислотности и хелатором ионов металлов [1], аскорбиновая кислота (ви-

тамин C) – жизненно важное соединение для живых организмов [2], сиаловые кислоты – важные составляющие структур клеточной поверхности [3]. Согласно Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>), альдоновые сахарные кислоты выявляются в биологических жидкостях и экскрементах человека. Так, D-глицериновая, D-глюконовая и L-ксилоновая кислоты обнаруживаются в слюне, а L-треоновая кислота и D-ксилоновая кислота – в крови и моче [4]. Поэтому изучение метаболизма альдоновых кислот может помочь определить их биологические функции на молекулярном уровне. Большинство альдоновых кислот катаболизируются посредством их последовательного дегидрирования и расщепления, в ходе которых альдоновые кислоты или их фосфаты сначала подвергаются дегидрированию с образованием промежуточных кетодезоксипроизводных соединений, которые затем расщепляются альдолазой на два фрагмента [5–9].

В связи с быстрым увеличением количества аминокислотных последовательностей в доступных базах данных белков, разнообразие путей катаболизма альдоновых кислот оказалось в

Принятые сокращения: EryDH – дегидрогеназа D-эритроновой кислоты; PanDH – (R)-пантоатдегидрогеназа; SSN – сеть сходства последовательностей (sequence similarity network); ThrDH – дегидрогеназа L-треоновой кислоты.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-334, 11.02.2020.

** 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. 4, 2020.

*** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

значительной степени недооцененным. Ранее группа Gerlt et al. охарактеризовала дегидрогеназу L-треоновую кислоту (ThrDH) и дегидрогеназу D-эритроновую кислоту (EryDH), которые участвуют в деградации тетрановых кислот в различных катаболических путях [10]. В настоящей работе с целью изучения новых дегидрогеназ альдоновых кислот и связанных с ними метаболических путей нами были отобраны четыре гомолога EryDH (UniProt ID: Q0KBD2) и десять гомологов ThrDH (UniProt ID: Q0KBC7) на основе сходства их аминокислотных последовательностей, разнообразия геномного контекста (рис. S1 Приложения) и доступности данных по геномной ДНК. В результате проведенной работы мы смогли продемонстрировать большое разнообразие субстратов для семи новых дегидрогеназ альдоновых кислот, а также определили два новых катаболических пути.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все сахара были приобретены в «Carbosynth» (Китай) или синтезированы химическим путем (Хуайхуа, Китай). Другие химические реактивы были приобретены в «Sigma-

Aldrich» (США), нуклеотиды — в «General Biosystems» (Анху, Китай), ферменты — в «New England Biolabs» (США), плазмиды — в «Novagen» (Германия), геномная ДНК была получена от ATCC (США) и DSMZ (Германия). Эксперименты были проведены с использованием спектрометра Varian 600 MHz NMR, спектрофотометров Nanodrop 2000 и UV-visible (AOE instruments UV-1800).

Генерирование сетей сходства последовательностей (SSN). Сеть сходства последовательностей (SSN — sequence similarity network) позволяет анализировать и визуализировать структурно-функциональные взаимосвязи в больших семействах белков. SSN были построены, как описано ранее [11]. Вкратце, аминокислотная последовательность белка, его идентификационный номер (ID) в базе данных UniProt или номер семейства в базе данных Pfam (например, PF14833 на рис. 1) использовали как входные данные для программы EFI-EST (<http://efi.igb.illinois.edu/efi-est/>). В сети репрезентативного узла (representative node network) показатель 50% rep, например, означает, что аминокислотные последовательности с идентичностью более 50% будут представлены в виде одного узла. Как правило, первоначально SSN создается на основе вырав-

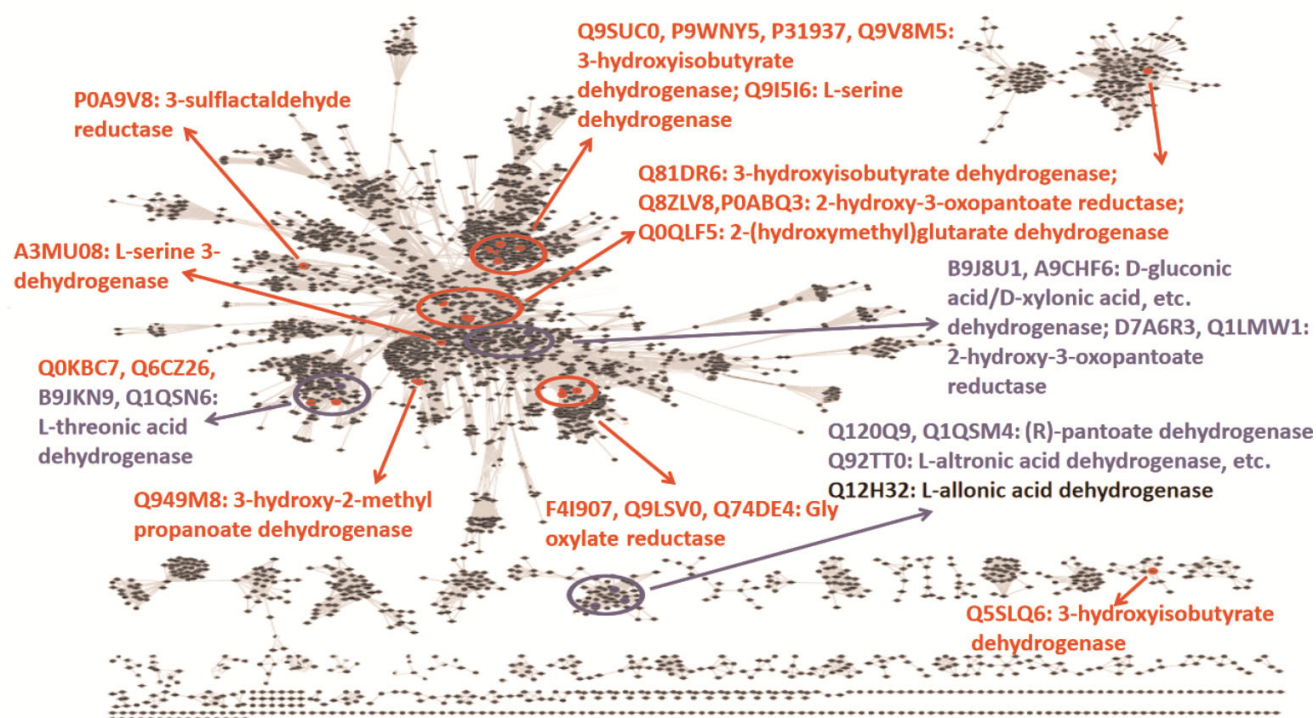


Рис. 1. Структурно-функциональное пространство гомологов ThrDH в контексте SSN (PF14833, 61 955 членов, e^{-67} , идентичность 40%, 50%rep). Ферменты с известными функциями выделены красным цветом, охарактеризованные в настоящей работе ферменты — синим цветом. Q12H32 показан темно-серым цветом (фермент с низкой активностью). С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Таблица 1. Активные альдоновые кислоты, использованные в настоящей работе в качестве субстратов для тестирования гомологов ThrDH и EryDH

Ферменты (UniProt ID)	Субстраты
Гомологи EryDH (PF01370)	
Q1QSN8/Q1QSM2/B9J8U2/A9CHF5	D-эритроновая кислота
Гомологи ThrDH (PF14833-PF02446)	
Q1QSN6	L-треоновая кислота
B9JKN9	L-треоновая кислота, L-идоновая кислота, L-рибоновая кислота
Q1QSM4/Q120Q9	(R)-пантоат
Q12H32	L-аллоновая кислота
Q92TT0	6-дезоксид-L-талоновая кислота, L-альтроновая кислота, L-луксоновая кислота, L-рамноновая кислота, L-манноновая кислота
B9J8U1/A9CHF6	L-треоновая кислота, L-идоновая кислота, D-глюконовая кислота, D-ксилоновая кислота, D-галактоновая кислота
D7A6R3/Q1LMW1	D-глицериновая кислота

Примечание. Полужирным шрифтом выделены субстраты, в отношении которых показана наибольшая ферментативная активность.

нивания, соответствующего ~30%-ной идентичности последовательности. Затем критерий оценки выравнивания может быть увеличен, чтобы различить разные функции белка (узлы с одинаковой функцией объединяются в один кластер).

Очистка ферментов. Фрагменты генов, кодирующих гомологи ThrDH и EryDH разных видов бактерий, амплифицировали по стандартному протоколу ПЦР с использованием соответствующих геномных ДНК и праймеров (табл. S1 Приложения) и лигировали в вектор PET-28a (рис. S2 Приложения). Полученными плазмидами с подтвержденными нуклеотидными последовательностями трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3) для экспрессии белков. Трансформированные клетки инокулировали в 1 л культуральной среды Лурия–Бертани (LB), содержащей 50 мкМ канамицина, и культивировали при 37 °C и 200 об/мин до достижения OD₆₀₀ 0,5–0,8. Для индукции экспрессии белка добавляли 0,4 мМ IPTG и инкубировали клетки в течение ночи (20 °C, 180 об/мин). Далее клетки собирали и суспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), лизировали с использованием французского пресса (French press) и центрифугировали. Полученный супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой, колонку промывали тремя объемами буфера А (25 мМ Tris, pH 8,0) и двумя объемами 25 мМ имидазола

в буфере А. Белки элюировали 250 мМ имидазолом в буфере А. Полученные белковые фракции анализировали в SDS-PAGE (рис. S3 Приложения). Фракции, содержавшие очищенные белки, объединяли и трижды диализовали против буфера А. Полученные белковые фракции быстро замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °C до их дальнейшего использования.

Анализ ферментативной активности. Сначала была проанализирована дегидрогеназная активность полученных ферментов – четырех гомологов EryDH и десяти гомологов ThrDH – в отношении библиотеки альдоновых сахарных кислот (34 монокарбоновых сахарных кислот, табл. S2 Приложения) в 96-ячеечном микропланшете. Дегидрогеназную активность оценивали путем измерения образующегося NADH ($\epsilon = 6,2 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 340 нм). Реакционная смесь (150 мкл, 25 °C) содержала 1 мкМ дегидрогеназы, 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ Mg²⁺, 0,5 мМ NAD⁺, 1 мМ субстрата. Значения оптической плотности регистрировали через каждую секунду в течение 5 мин. Субстраты, в отношении которых была выявлена наибольшая ферментативная активность, отбирали для проведения более тщательных кинетических измерений с использованием описанного выше метода (табл. 1). Для запуска ферментативной реакции в 200 мкл реакционной смеси, содержащей 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ Mg²⁺,

Таблица 2. Репрезентативные данные кинетики для гомологов ThrDH

Ферменты (UniProt ID) и субстраты	K_M , mM	k_{cat} , c^{-1}	k_{cat}/K_M , $c^{-1} \cdot M^{-1}$
B9JKN9			
L-треоновая кислота	$1,19 \pm 0,16$	$20,00 \pm 0,92$	$1,68 \times 10^5$
L-идоновая кислота	$1,98 \pm 0,42$	$16,40 \pm 1,66$	$8,3 \times 10^3$
B9J8U1			
D-глюконовая кислота	$0,62 \pm 0,06$	$22,40 \pm 0,65$	$3,6 \times 10^4$
L-идоновая кислота	$3,60 \pm 0,34$	$21,10 \pm 0,92$	$5,8 \times 10^3$
L-треоновая кислота	$1,00 \pm 0,13$	$4,20 \pm 0,17$	$4,1 \times 10^3$
D-ксилоновая кислота	$4,45 \pm 0,43$	$15,20 \pm 0,91$	$3,4 \times 10^3$
Q92TT0			
6-дезоксид-L-талоновая кислота	$2,10 \pm 0,31$	$6,30 \pm 0,46$	$3,0 \times 10^3$
L-альтронная кислота	$3,10 \pm 0,32$	$7,90 \pm 0,45$	$2,5 \times 10^3$
D7A6R3			
D-глицериновая кислота	$0,030 \pm 0,004$	$9,30 \pm 0,28$	$3,2 \times 10^5$
Q1QSM4			
(R)-пантоат	$0,23 \pm 0,03$	$6,10 \pm 0,23$	$2,7 \times 10^4$
B9J8U2			
D-эритроновая кислота	$0,82 \pm 0,10$	$1,09 \pm 0,04$	$1,3 \times 10^3$
Q1QSM2			
D-эритроновая кислота	$1,24 \pm 0,18$	$15,80 \pm 0,75$	$1,27 \times 10^4$

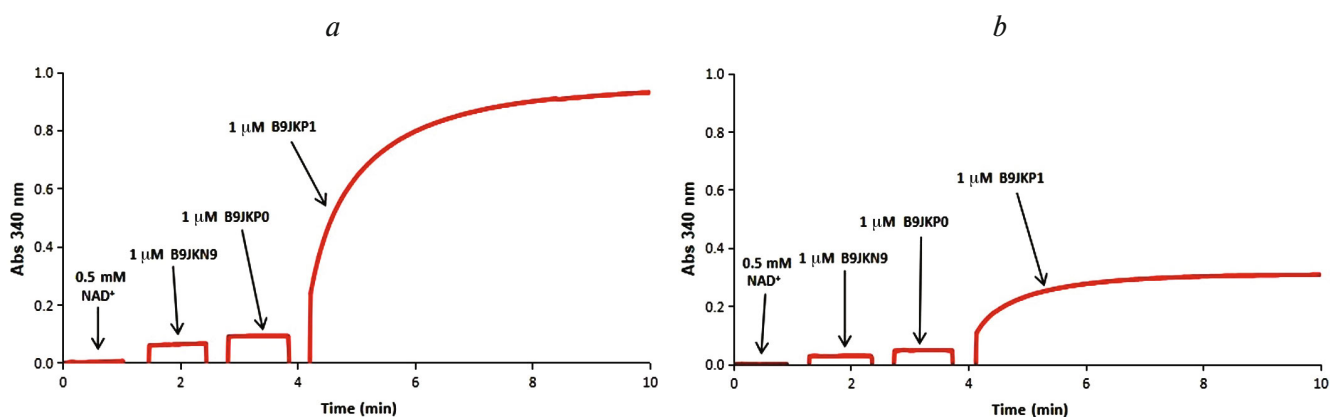


Рис. 2. Спектрофотометрический анализ катаболических путей, ассоциированных с L-треоновой и L-идоновой кислотами. Реакционные смеси содержали 100 mM Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1,0 mM Mg²⁺, 0,5 mM NAD⁺, 0,5 mM АТР и 1 mM субстратов L-треоновой (a) или L-идоновой кислоты (b). Последовательность добавления в реакционную смесь ферментов ThrDH (B9JKN9), AP_endo (B9JKP0) и DUF1537 (B9JKP1) показана на каждой панели.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

0,5 mM NAD⁺ и различные концентрации субстратов альдоновых кислот, добавляли фермент в соответствующей концентрации. Начальные скорости реакции при различных концентрациях субстрата соответствовали уравнению Михаэлиса–Ментен (табл. 2).

Определение метаболических путей. Последовательность реакций катаболических путей для L-треоновой и L-идоновой кислот определяли путем последовательного добавления соответствующих ферментов и последующей регистрации изменений значений оптической плотности при 340 нм. К 200 мкл реакционной смеси (100 mM Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 mM Mg²⁺, 0,5 mM NAD⁺, 0,5 mM ATP, 1 mM L-треоновой кислоты или 1 mM L-идоновой кислоты) добавляли 1 мкМ дегидрогеназы (B9JKN9) и 1 мкМ изомеразы (B9JKP0). По достижении состояния равновесия в реакционную смесь вносили 1 мкМ киназы DUF1537 (B9JKP1) (рис. 2). В случае D-глюкрат-ассоциированного катаболического пути ферментативную активность дегидратазы D-глюкарной кислоты (Q1LQ56) и альдозазы (Q1LMW0) подтверждали продукцией пирувата, которую регистрировали с помощью сопряженной с лактатдегидрогеназой реакции в присутствии NADH. Реакционная смесь (200 мкл, 25 °C) содержала 100 mM Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 mM Mg²⁺, 0,2 mM NADH и 1,0 mM D-глюкрат. Для инициации реакции в реакционную смесь добавляли 2 единицы LDH, 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56), 1 мкМ альдозазы (Q1LMW0) и регистрировали изменения значений оптической плотности при 340 нм. Дегидрогеназную активность Q1LMW1 определяли по такому же протоколу, но вместо LDH в реакционную смесь добавляли 0,05 мкМ Q1LMW1 (рис. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Субстратная специфичность дегидрогеназ. Нами была выявлена специфичность четырех гомологов EryDH (UniProt ID: Q1QSN8, Q1QSM2, B9J8U2, A9CHF5; идентичность аминокислотной последовательности ~38–76%) в отношении D-эритроновой кислоты, что согласуется с данными предыдущей работы [10], в то время как гомологи ThrDH были способны катализировать реакции с разнообразными субстратами (табл. 1).

Из представленной на рис. 1 SSN для гомологов ThrDH (рис. 1) видно, что Q1QSN6 обладает специфической активностью в отношении L-треоновой кислоты (расположена в верхнем левом синем круге). Однако B9JKN9 (~49%-ная идентичность аминокислотной последовательности с Q1QSN6) может окислять как L-треоновую

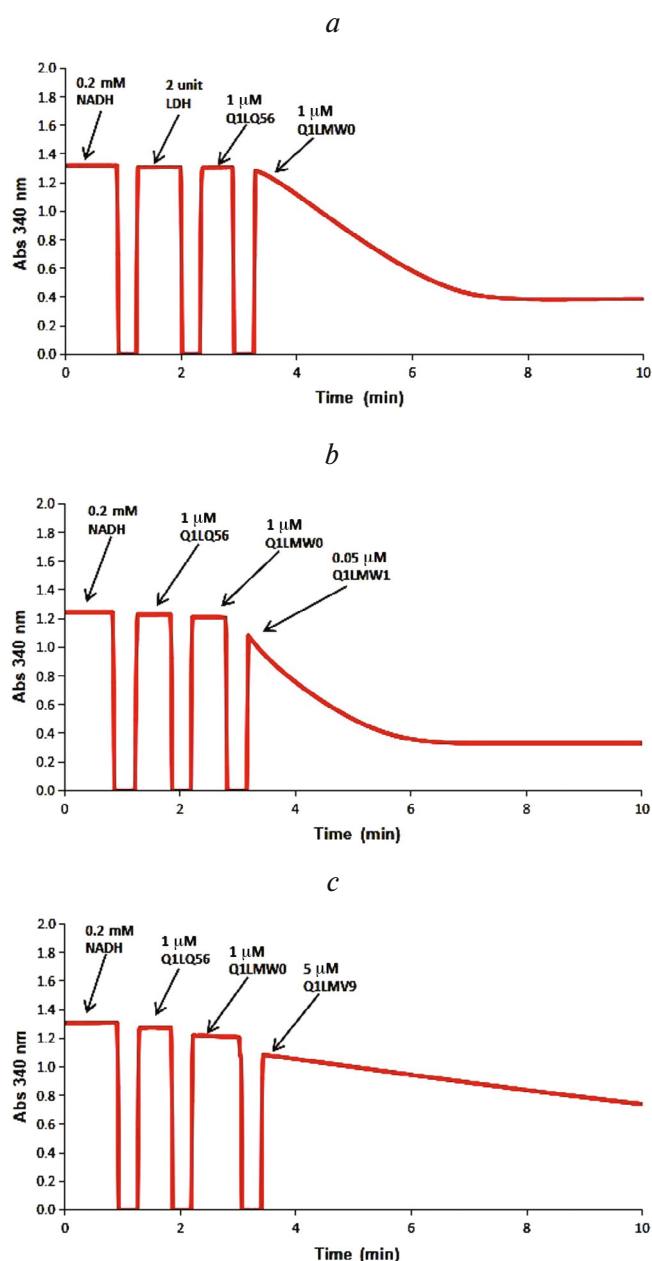


Рис. 3. Спектрофотометрический анализ метаболического пути, ассоциированного с D-глюкратом. Исходная реакционная смесь содержала 100 mM Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1,0 mM Mg²⁺, 0,2 mM NADH, 1 mM D-глюкарата. *a* – для определения ферментативной активности Q1LQ56 и Q1LMW0 в реакционную смесь добавляли 2 единицы LDH, 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56) и 1 мкМ альдозазы (Q1LMW0); *b* – для определения редуктазной активности Q1LMW1 в отношении 2-гидрокси-3-оксопантаноевой кислоты в реакционную смесь добавляли 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56), 1 мкМ альдозазы (Q1LMW0) и 0,05 мкМ ThrDH (Q1LMW1); *c* – для определения ферментативной активности Q1LMV9 в отношении пирувата и 2-гидрокси-3-оксопантаноевой кислоты в реакционную смесь добавляли 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56), 1 мкМ альдозазы (Q1LMW0) и 5 мкМ Q1LMV9. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

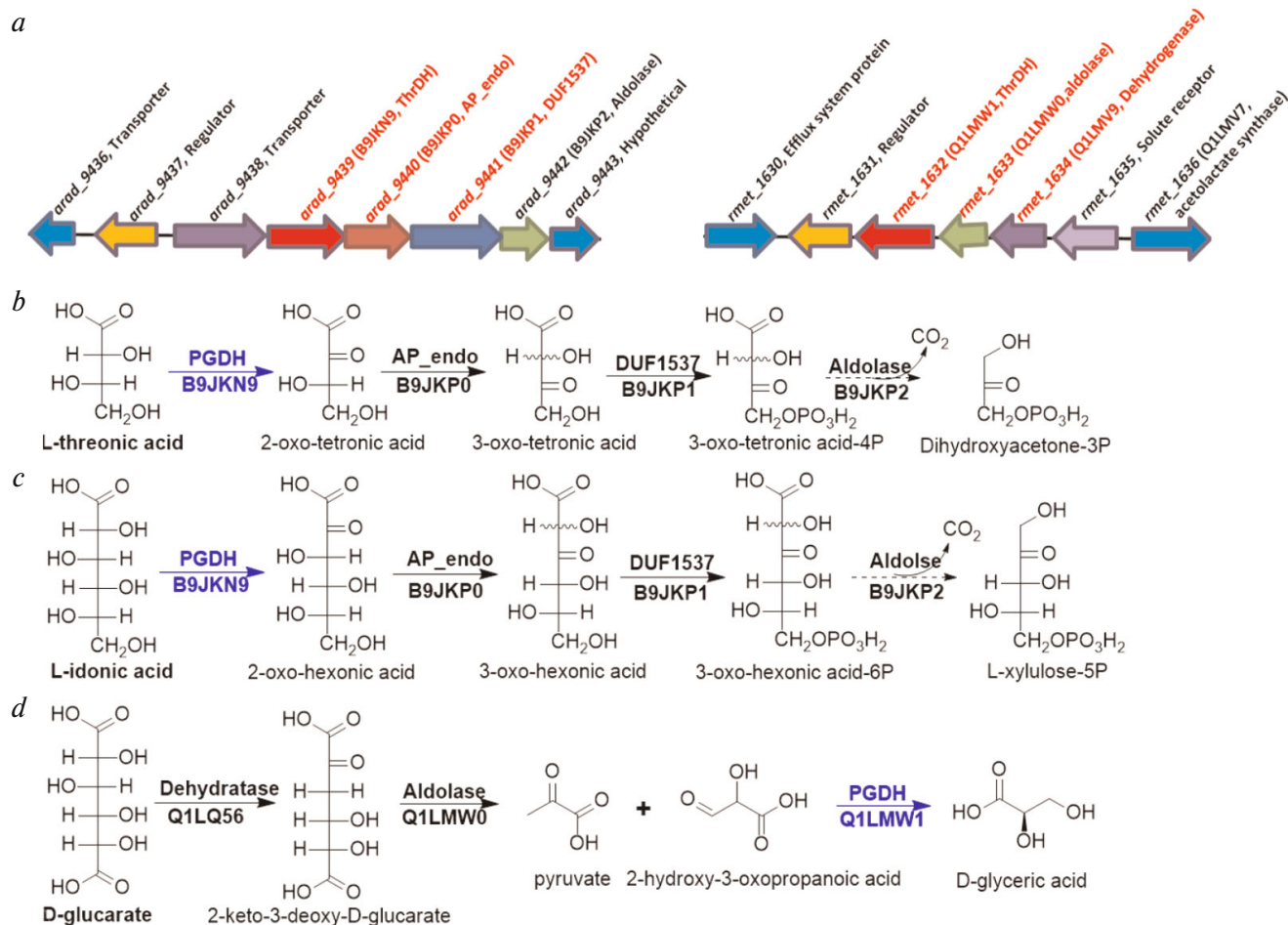


Рис. 4. Генные контексты для дегидрогеназы L-идоновой кислоты (B9JKN9), редуктазы 2-гидрокси-3-оксопентановой кислоты (Q1LMW1) (a) и их соответствующие катаболические пути (b–d). a – Генный контекст для B9JKN9 (arad_9439) и Q1LMW1 (rmet_1632), выделено красным цветом. Субстрат Q1LMV9 (rmet_1634) неизвестен, однако эта дегидрогеназа проявляет редуктазную активность в отношении фенилпирииноградной и α -кетоглутаровой кислот; b, c – катаболические пути, ассоциированные с L-треоновой и L-идоновой кислотами у *Agrobacterium radiobacter* K84. Разные ферменты, участвующие в этих путях, вызывают деградацию обеих альдоновых сахарных кислот с образованием соответствующих фосфатов кетопроизводных сахаров; d – катаболический путь D-глюкарата у *Ralstonia metallidurans* CH34; гомологи ThrDH выделены синим цветом.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

кислоту, так и L-идоновую кислоты (табл. 1 и 2). D7A6R3 и Q1LMW1 (63%-ная идентичность аминокислотной последовательности, располагаются в верхнем правом синем круге) специфически окисляют D-глицериновую кислоту с образованием 2-гидрокси-3-оксопентановой кислоты, в то время как для B9J8U1 и A9CHF6 (67%-ная идентичность аминокислотной последовательности) была показана активность в отношении четырех субстратов (D-глюконовая, L-идоновая, L-треоновая и D-ксилоновая кислоты, табл. 1). Кроме того, выявлены новые ферменты: (R)-пантоатдегидрогеназа (PanDH, Q120Q9 и Q1QSM4, 61%-ная идентичность аминокислотной последовательности) и дегидрогеназа L-альтритоновой кислоты (расположены в

нижнем синем круге). Кинетические величины (k_{cat}/K_M) вышеперечисленных ферментов с субстратами альдоновых сахарных кислот колеблются в диапазоне от 10^3 до 10^5 с⁻¹ М⁻¹ (табл. 2).

Определение катаболического пути. Геномные контексты для B9JKN9 и Q1LMW1 показаны на рис. 4, a. Проведенные эксперименты *in vitro* подтвердили, что L-идоновая кислота может подвергаться деградации путем, сходным с известным путем катаболизма L-треоновой кислоты (рис. 4, b) [10]. В этом метаболическом пути L-идоновая кислота окисляется с помощью B9JKN9 с образованием 2-оксогексоновой кислоты, которая затем изомеризуется и фосфорилируется с участием изомеразы AP_endo

(B9JKP0) и киназы DUF1537 (B9JKP1). На заключительном этапе нестабильная 3-оксо-гексоновая кислота-6P может распадаться с образованием L-ксилоулозо-5P — самопроизвольно либо под действием альдозазы (B9JKP2) [10, 12] (рис. 2; рис. 4, с).

У *Ralstonia metallidurans* CH34 Q1LMW1 принимает участие в типичном пути катаболизма D-глюкарата [13]. Сначала D-глюкат дегидрируется D-глюкатдегидратазой (Q1LQ56) с образованием 2-кето-3-дезоксид-глюкарата. Далее этот промежуточный продукт может расщепляться альдозазой (Q1LMW0) с образованием пирувата и 2-гидрокси-3-оксопропановой кислоты (полуальдегид тартроновой кислоты). В завершение Q1LMW1 превращает 2-гидрокси-3-оксопропановую кислоту в D-глицериновую кислоту (рис. 3; рис. 4, d).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Альдоновые сахарные кислоты широко распространены в окружающей среде и в биологических жидкостях человека и выполняют множество важных физиологических функций [14, 15]. Однако до настоящего времени проводились лишь единичные исследования метаболизма альдоновых сахарных кислот [16, 17]. В данной работе нами была предпринята попытка определить метаболические пути посредством тщательного анализа разнообразия субстратов двух известных семейств дегидрогеназ сахарных

кислот (EryDH: PF01370; ThrDH: PF14833 и PF03446). Во-первых, с использованием комбинированного биоинформатического анализа (анализ гомологии с помощью SSN и анализ индивидуальных геномных контекстов) мы отобрали ферменты, которые могли бы обладать различными функциями. Во-вторых, основываясь на структуре субстратов (-COOH/-SO₃H) ранее охарактеризованной ThrDH, отображенные нами гомологи ThrDH были подвергнуты скринингу против библиотеки 34 сахарных кислот. Затем гомологи ThrDH были протестированы индивидуально с соответствующими субстратами на предмет детального сравнения кинетических параметров. В завершение на основании выявленных активностей ThrDH по отношению к тестируемым субстратам были изучены ассоциированные с этими ферментами метаболические пути.

На основе полученных результатов можно утверждать, что гомологи EryDH специфичны в отношении D-эритроновой кислоты, в то время как функции гомологов ThrDH довольно разнообразны. Некоторые гомологи ThrDH являются разнородными и проявляют высокую активность в отношении различных структурно сходных сахарных кислот. Например, субстраты фермента Q92TT0 (6-дезоксид-L-талоновая кислота, L-альтроновая кислота) имеют (2R)-конфигурацию, в то время как субстраты B9JKN9/B9J8U1/A9CHF6 (L-треоновая, L-идоновая, D-ксилоновая и D-глюконовая кислоты) — консервативную (2R,3S)-конфигурацию (рис. 5).

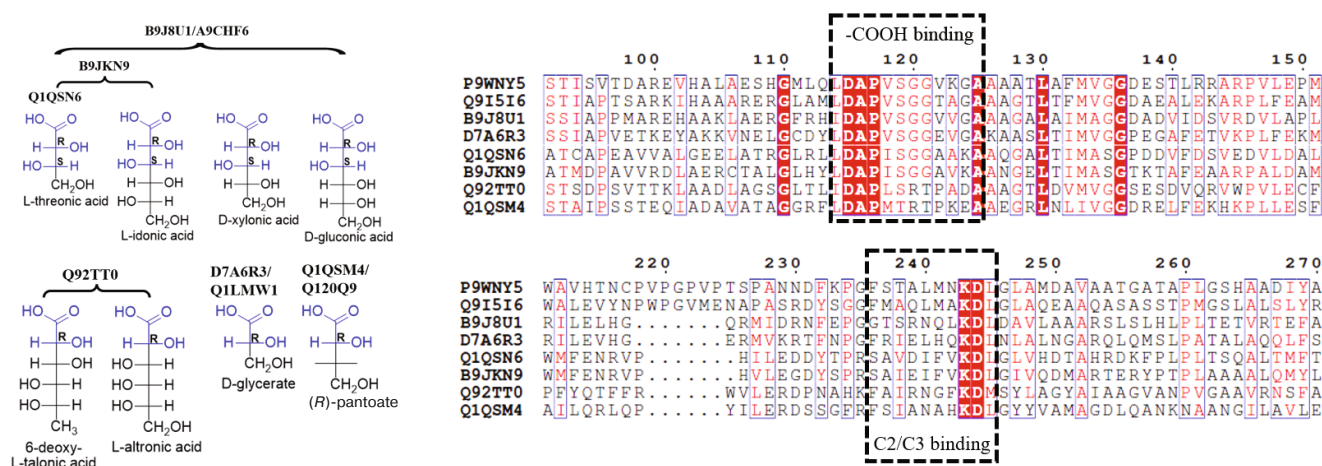


Рис. 5. Структура субстратов и сравнение аминокислотных последовательностей гомологов ThrDH. Консервативные структуры субстратов показаны синим цветом (левая панель), последовательности субстратсвязывающих мотивов выделены пунктирными рамками (правая панель). Для проведения выравнивания аминокислотных последовательностей были использованы структуры дегидрогеназы 3-гидроксиизомасляной кислоты (P9WNY5, PDB: 5Y8N) из *Mycobacterium tuberculosis* и L-сериндегидрогеназы (Q9I5I6, PDB: 3OBB) из *Pseudomonas aeruginosa*, идентичность их аминокислотных последовательностей с анализируемыми в данной работе ThrDHs составляет 22,4–29,5%. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

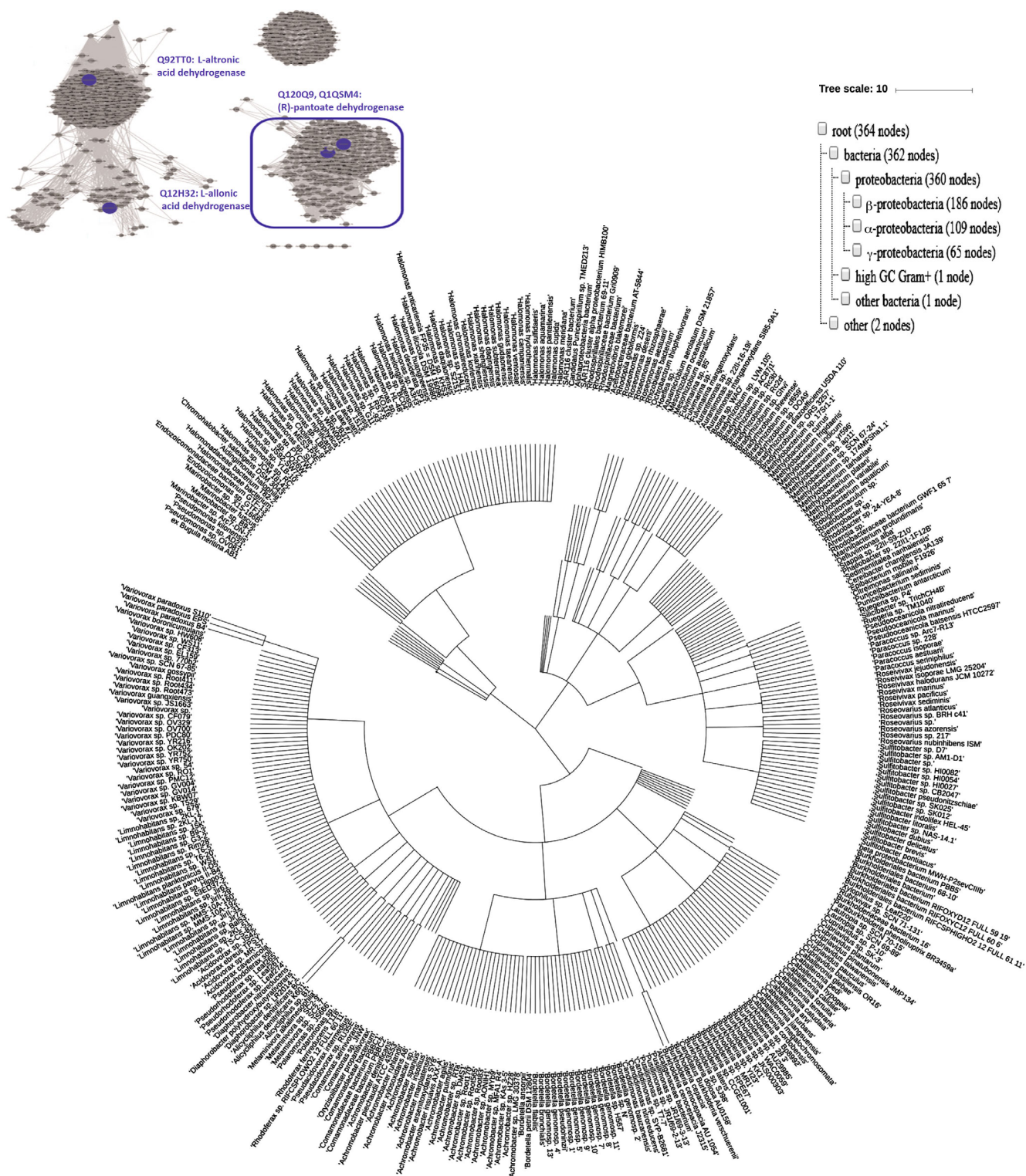


Рис. 6. Верхняя часть: SSN для 3000 гомологов Q1QSM4 (e^{-72} , сходство 50%, 90% гер). Четыре охарактеризованных в настоящей работе гомолога ThrDH выделены синим цветом. Для проведения филогенетического анализа был отобран кластер с (R)-пантаатдегидрогеназой. Нижняя часть: присутствие (R)-пантаатдегидрогеназы (выделена синей рамкой в верхней части рисунка) в различных организмах. Идентификационные номера из SSN были использованы для построения филогенетического дерева с помощью NCBI Taxonomy common tree: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>. Затем скачанный файл с филогенетическим деревом открывали в программе iTOL (<https://itol.embl.de/upload.cgi>).

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Некоторые гомологи ThrDH (Q1QSN6, Q1QSM4, Q120Q9, D7A6R3 и Q1LMW1) катализируют реакцию с субстратами, типичными для дегидрогеназы L-треоновой кислоты, дегидрогеназы D-глицериновой кислоты и новой (R)-пантоатдегидрогеназы (PanDH). Выравнивание аминокислотных последовательностей этих ThrDHs и дегидрогеназ β -гидроксикислот позволило выявить присутствие консервативных последовательностей, необходимых для связывания карбоксильных групп (мотив DAPVSGG) и соседних атомов углерода (мотив FXXXXXXKDL) [18, 19]. Однако из-за ограниченности данных по структурам с близкой гомологией трудно выявить корреляцию между субстратной специфичностью и аминокислотной последовательностью фермента.

В отличие от широко распространенной PanDH (PF02558-PF08546), которая является важным ферментом биосинтеза кофермента A [20], (R)-пантоатдегидрогеназа (Q1QSM4, PF14833-PF03446) обнаружена исключительно в протеобактериях (рис. 6). Несмотря на то что Q12H32 (идентичность ее аминокислотной последовательности с Q1QSM4 составляет 35,7%), Q92TT0 и Q1QSM4 демонстрируют различную субстратную специфичность, они локализируются в одном кластере в сети гомологов ThrDH (рис. 1). Увеличение строгости критериев оценки выравнивания (e^{-72}) позволило разделить эти ферменты на разные кластеры в соответствии с их функциями (рис. 6).

Приведенные выше данные о субстратной специфичности гомологов ThrDH согласуются с данными о разнообразии их геномного контекста (рис. S1 Приложения). Аналогично дегидрогеназе L-треоновой кислоты (Q1QSN6) и дегидрогеназе L-идоновой кислоты (B9JKN9) было доказано, что DUF1537 и соседняя альдолаза участвуют в деградации сахаров, представленных на рис. 4 [10]. Однако B9J8U1 и A9CHF6, которые демонстрируют сходную активность в

отношении L-треоновой и L-идоновой кислот, имеют геномный контекст дегидратаз (треонин-дегидратаза, дегидратаза дигидроксикислот), что может указывать на их участие в различных метаболических путях. В отличие от PanDH, которая кластеризуется с другими ферментами биосинтеза пантотената [21], охарактеризованная в настоящей работе (R)-пантоатдегидрогеназа (Q120Q9, Q1QSM4) имеет тенденцию образовывать пару с альдегиддегидрогеназой. Кроме того, две дегидрогеназы D-глицериновой кислоты (Q1LMW1, D7A6R3) имеют разные геномные контексты. Так, Q1LMW1 кластеризуется с альдолазой (Q1LMW0) и катализирует следующую за этим ферментом стадию в катаболизме D-глюкарата у *Ralstonia metallidurans* CH34 (рис. 4). В то же время D7A6R3, возможно, вовлечена в метаболизм гликолевой кислоты благодаря близко расположенной карболигазе глиоксильной кислоты [22]. Дегидрогеназа L-альтроновой кислоты (Q92TT0) и находящиеся поблизости метилтрансфераза и гликозилат указывают на существование совершенно незнакомого пути, который необходимо будет определить.

Проведенная в настоящей работе идентификация субстратов для гомологов ThrDH не только проясняет метаболические пути этих соединений, но также способствует дальнейшему выявлению физиологических функций гомологов ThrDH.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке National Natural Science Foundation, China (grant No. 31970087) и South China Normal University (start-up grant).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., and Larroche, C. (2006) Gluconic acid: properties, applications and microbial production, *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 185-195.
2. Smirnoff, N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**, 229-235.
3. Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L., and Steenbergen, S. M. (2004) Diversity of microbial sialic acid metabolism, *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **68**, 132-153, doi: 10.1128/mmbr.68.1.132-153.2004.
4. Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S. et al. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D603-D610, doi: 10.1093/nar/gkn810.
5. Holzer, H., and Holldorf, A. (1957) Isolation of D-glycerate dehydrogenase, some properties of the enzyme and its application to the enzymic-optic determination of hydroxypyruvate in presence of pyruvate, *Biochem. Z.*, **329**, 292-312.
6. Dreyer, J. L. (1987) The role of iron in the activation of mannonic and altronic acid hydratases, two Fe-requiring hydro-lyases, *Eur. J. Biochem.*, **166**, 623-630, doi: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13559.x.
7. Dahms, A. S., and Donald, A. (1982) D-xylo-aldonate dehydratase, *Methods Enzymol.*, **90**, E302-E305, doi: 10.1016/s0076-6879(82)90145-8.

8. Shimizu, T., Takaya, N., and Nakamura, A. (2012) An L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* species 43P, *J. Biol. Chem.*, **287**, 40448-40456, doi: 10.1074/jbc.M112.403055.
9. Wichelecki, D. J., Balthazor, B. M., Chau, A. C., Vetting, M. W., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Luk, T., Patskovsky, T. Y., Stead, M. B., Hillerich, B. S., Seidel, R. D., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. (2014) Discovery of function in the enolase superfamily: D-mannonate and D-gluconate dehydratases in the D-mannonate dehydratase subgroup, *Biochemistry*, **53**, 2722-2731, doi: 10.1021/bi500264p.
10. Zhang, X., Carter, M. S., Vetting, M. W., Francisco, B. S., Zhao, S., Al-Obaidi, N. F., Solbiatia, J. O., Thiavilled, J. J., Crecy-Lagard, V., Jacobson, M. P., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. (2016) Assignment of function to a domain of unknown function: DUF1537 is a new kinase family in catabolic pathways for acid sugars, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4161-E4169, doi: 10.1073/pnas.1605546113.
11. Gerlt, J. A., Bouvier, J. T., Davidson, D. B., Imker, H. J., Sadkhin, B., Slater, D. R., and Whalen, K. L. (2015) Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): a web tool for generating protein sequence similarity networks, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1019-1037, doi: 10.1016/j.bbapap.2015.04.015.
12. Luo, S., and Huang, H. (2018) Discovering a new catabolic pathway of D-ribonate in *Mycobacterium smegmatis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **505**, 1107-1111, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.033.
13. Aghaie, A., Lechaplais, C., Sirven, P., Tricot, S., Besnard-Gonnet, M., Muselet, D., Berardinis, V., Kreimeyer, A., Gyapay, G., Salanoubat, M., and Perret, A. (2008) New insights into the alternative D-glucarate degradation pathway, *J. Biol. Chem.*, **283**, 15638-15646, doi: 10.1074/jbc.M800487200.
14. Severi, E., Hood, D. W., and Thomas, G. H. (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens, *Microbiology*, **153**, 2817-2822, doi: 10.1099/mic.0.2007/009480-0.
15. Adachi, O., Hours, R. A., Shinagawa, E., Akakabe, Y., Ykushi, T., and Matsushita, K. (2011) Enzymatic synthesis of 4-pentulosonate (4-keto-D-pentonate) from D-aldopentose and D-pentonate by two different pathways using membrane enzymes of acetic acid bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2418-2420, doi: 10.1271/bbb.110575.
16. Arrigoni, O., and De Tulio, M. C. (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, *Biochim. Biophys. Acta*, **1569**, 1-9, doi: 10.1016/s0304-4165(01)00235-5.
17. Yew, W. S., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Rakus, J. F., Pierce, R. W., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. (2006) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: L-fuconate dehydratase from *Xanthomonas campestris*, *Biochemistry*, **45**, 14582-14597, doi: 10.1021/bi061687o.
18. Tchigvintsev, A., Singer, A., Brown, G., Flick, R., Evdokimova, E., Tan, K., Gonzalez, C. F., Savchenko, A., and Yakunin, A. F. (2012) Biochemical and structural studies of uncharacterized protein PA0743 from *Pseudomonas aeruginosa* revealed NAD-dependent L-serine dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **287**, 1874-1883, doi: 10.1074/jbc.M111.294561.
19. Srikalaivani, R., Singh, A., Vijayan, M., and Surolia, A. (2018) Structure, interactions and action of *Mycobacterium tuberculosis* 3-hydroxyisobutyric acid dehydrogenase, *Biochem. J.*, **475**, 2457-2471, doi: 10.1042/BCJ20180271.
20. Zheng, R., and Blanchard, J. S. (2000) Kinetic and mechanistic analysis of the *E. coli* panE-encoded ketopantoate reductase, *Biochemistry*, **39**, 3708-3717, doi: 10.1021/bi992676g.
21. Webb, M. E., Smith, A. G., and Abell, C. (2004) Biosynthesis of pantothenate, *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 695-721, doi: 10.1039/b316419p.
22. Grostern, A., Sales, C. M., Zhuang, W. Q., Erbilgin, O., and Alvarez-Cohen, L. (2012) Glyoxylate metabolism is a key feature of the metabolic degradation of 1,4-dioxane by *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3298-3308, doi: 10.1128/AEM.00067-12.

SUBSTRATE DIVERSITY OF L-THREONIC ACID DEHYDROGENASE HOMOLOGS*,**

C. F. Zhang^{1#}, Y. P. Liu^{1#}, X. X. Wu¹, X. S. Zhang^{2***}, and H. Huang^{1***}

¹ Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, 510631 Guangdong, China; E-mail: hhuang@m.scnu.edu.cn

² Institute of Ecological Science, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631 China; E-mail: xszhang@scnu.edu.cn

Received November 26, 2019

Revised January 7, 2020

Accepted January 21, 2020

Despite physiological importance of aldonic sugar acids for living organisms, little is known about metabolic pathways of these compounds. Here, we investigated the functional diversity of homologs of L-threonic acid dehydrogenase (ThrDH; UniProt ID: Q0KBC7), an enzyme composed of two NAD-binding domains (PF14833 and PF03446). Ten ThrDH homologs with different genomic context were studied; seven new enzymatic activities were identified, such as (R)-pantoate dehydrogenase, L-altronic acid dehydrogenase, 6-deoxy-L-talonate dehydrogenase, L-idonic acid dehydrogenase, D-xylonic acid dehydrogenase, D-gluconic acid dehydrogenase, and 2-hydroxy-3-oxopantoate reductase activities. Two associated metabolic pathways were identified: L-idonic acid dehydrogenase was found to be involved in the degradation of L-idonic acid through oxidation/decarboxylation in *Agrobacterium radiobacter* K84, while 2-hydroxy-3-oxopantoate reductase was found to participate in D-glucarate catabolism through dehydration/cleavage in *Ralstonia metallidurans* CH34.

Keywords: (R)-pantoate dehydrogenase, L-idonic acid catabolism, D-glucarate catabolism, L-altronic acid dehydrogenase, D-xylonic acid dehydrogenase

УДК 577.214.6; 575.113.2

ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА НА СТАДИИ ЭМБРИОНА ПРИВОДИТ К ПОДАВЛЕНИЮ ЕГО ГЕТЕРОХРОМАТИНОВОЙ *транс*-ИНАКТИВАЦИИ У ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ *Drosophila melanogaster****

© 2020 А.А. Солодовников, В.А. Гвоздев, С.А. Лавров***

Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия; электронная почта: slavrov@img.ras.ru

Поступила в редакцию 30.12.2019

После доработки 24.02.2020

Принята к публикации 24.02.2020

Перемещение гена в результате хромосомной перестройки из эухроматина к конститутивному гетерохроматину может сопровождаться эпигенетической инактивацией этого гена — *цис*-инактивацией. При гетерохроматиновой *транс*-инактивации происходит репрессия репортерных трансгенов в нормальной хромосоме под воздействием вызывающей *цис*-инактивацию гомологичной хромосомы с перестройкой. *Транс*-инактивация является результатом соматического спаривания гомологов и перемещения участка нормальной хромосомы в гетерохроматиновый компартмент ядра. Показано, что степень *транс*-инактивации репортерного гена *UAS-eGFP* под влиянием перестройки *In(2)A4* у взрослых мух зависит от уровня его транскрипции. В настоящей работе детально исследовали эпигенетическое наследование активного/репрессированного состояния *транс*-инактивируемого репортерного гена при разных уровнях экспрессии путем измерения уровня флуоресценции eGFP в отдельных клетках мальпигиевых сосудов взрослых мух. Было обнаружено, что высокий уровень экспрессии на эмбриональной стадии препятствует *транс*-инактивации *eGFP* у взрослых особей даже при низком уровне экспрессии на постэмбриональных стадиях развития.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетерохроматин, *Drosophila*, эффект положения, *транс*-инактивация, экспрессия, GAL4, GAL80^{ts}.

DOI: 10.31857/S0320972520040077

Эффектами положения (ЭП) называются нарушения экспрессии генов, происходящие при изменении локализации генов в геноме без нарушения их нуклеотидной последовательности. Частным случаем ЭП является гетерохроматиновый эффект положения, при котором экспрессия эухроматиновых генов подавляется при их перемещении к конститутивному гетерохроматину. В результате хромосомной перестройки эухроматин вблизи новых эу-гетерохроматиновых границ приобретает свойства гетерохроматина (гетерохроматинизация), этот процесс может распространяться на большие рас-

стояния (сотни т.п.н.—миллион п.н.). При гетерохроматинизации в эухроматиновых районах появляются специфические для гетерохроматина белки (HP1a и другие) и модификации гистонов (H3K9me2/3) [1–3], что и приводит к нарушениям работы генов. При гетерохроматиновом ЭП гены могут инактивироваться лишь в части клеток на стадии эмбриона, при этом активное/репрессированное состояние способно эпигенетически наследоваться в клеточной линии, давая в результате мозаичную экспрессию в пределах одной ткани.

В некоторых случаях перестроенная хромосома с новыми эу-гетерохроматиновыми границами способна инактивировать гены нормальной неперестроенной хромосомы [4–6]. Это явление, *транс*-инактивация, не может быть объяснено распространением гетерохроматина вглубь эухроматина от новой границы и связано, по современным представлениям, с перемещением эухроматинового района в гетерохроматиновый компартмент ядра при соматическом спаривании нормальной хромосомы и гомологичной хромосомы с перестройкой. При *транс*-инактивации происходит формирование гете-

Принятые сокращения: *UAS-eGFP* — ген *eGFP* под контролем регуляторного элемента *UAS*, *A4* — хромосомная инверсия *In(2)A4*, ЭП — эффекты положения.

* 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. 4, 2020.

** Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-351, 13.04.2020.

*** Адресат для корреспонденции.

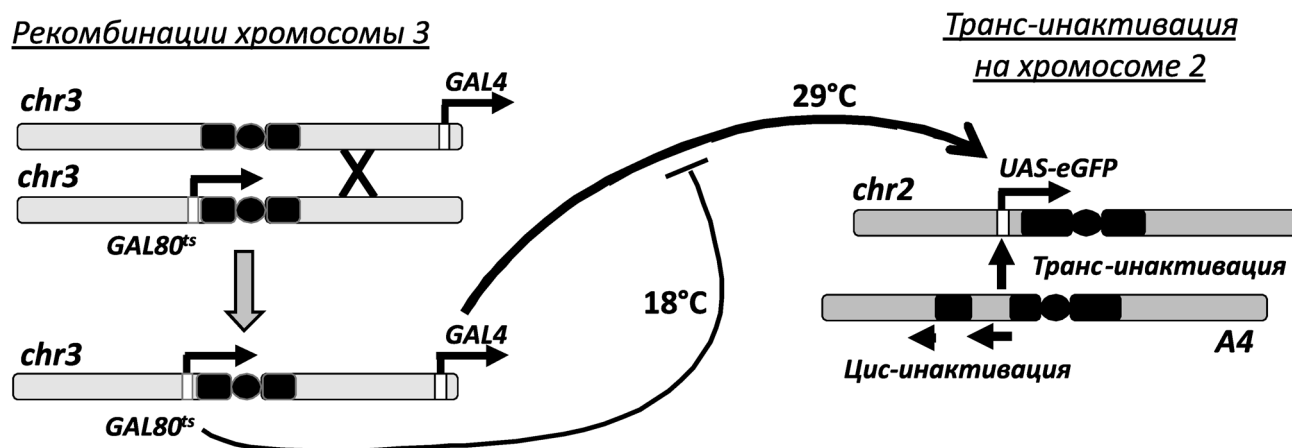


Рис. 1. Система контроля экспрессии репортерного гена. Хромосома 2 с перестройкой *A4* вызывает *транс*-инактивацию репортера *UAS-eGFP* в гомологичной нормальной хромосоме. Хромосома 3 получена путем рекомбинации и несет источники *GAL4* (*tubGal4*) и *GAL80^{ts}* (*tubGal80^{ts}*). Повышение температуры приводит к разрушению репрессора *GAL80^{ts}*, повышению содержания активного *GAL4* и усилению транскрипции *UAS-eGFP*

рохроматина *de novo* в нормальной хромосоме [7–10].

Хромосомная инверсия *In(2)A4* (далее *A4*, рис. 1) вызывает *цис*-инактивацию генов рядом с новыми эу-гетерохроматиновыми границами и *транс*-инактивацию репортерных конструкций в гомологичной хромосоме [6, 9–12]. С целью изучения наследуемости эпигенетических состояний *транс*-инактивируемого гена в процессе развития, были получены мухи, содержащие репортерный ген *UAS-eGFP* в нормальной хромосоме 2, инверсию *A4* в гомологичной хромосоме и комбинацию трансаktиватора *GAL4* и термочувствительной формы репрессора *GAL80* (*GAL80^{ts}*) в хромосоме 3. Комбинация *GAL4* и *GAL80^{ts}* позволяет регулировать экспрессию репортерного гена путем изменения температуры развития мух. Генетическая система была использована для исследования зависимости степени *транс*-инактивации репортерного гена у взрослых мух от уровня его экспрессии на разных стадиях развития. Показано, что высокий уровень экспрессии на эмбриональной стадии приводит к эпигенетически наследуемой в ходе дальнейшего развития устойчивости репортерного гена к *транс*-инактивации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе линии мух. Линия *w^{67c23}; In(2)A4/CyO*, содержащая вызывающую *транс*-инактивацию хромосомную перестройку *In(2)A4* (*A4*), получена и исследуется в ОМГК ИМГ РАН [6].

Следующие линии получены из коллекции Bloomington («Bloomington *Drosophila* Stock

Center», США), номера линий соответствуют идентификаторам в коллекции: линия 7018 (*w^{*}; sna^{ScO}/CyO; P{tubP-GAL80^{ts}}7*) содержит на хромосоме 3 источник белка *GAL80^{ts}* под промотором *alphaTub84B* [13]; линия 5138 (*y¹ w^{*}; P{tubP-GAL4}LL7/TM3 Sb¹ Ser¹*) содержит источник *GAL4* под промотором *alphaTub84B* [14].

Линия *w^{*}; UAS-eGFP/CyO; P{tubP-GAL4}LL7; P{tubP-GAL80^{ts}}7/TM3 Sb¹ Ser¹* содержит репортерный ген *UAS-eGFP* на хромосоме 2 [11] и регуляторные гены *GAL4* и *GAL80^{ts}* на хромосоме 3. Хромосома 3 с *GAL4* и *GAL80^{ts}* получена путем рекомбинации между линиями 7018 (*w^{*}; sna^{ScO}/CyO; P{tubP-GAL80^{ts}}7*) и 5138 (*y¹ w^{*}; P{tubP-GAL4}LL7/TM3 Sb¹ Ser¹*). Описание скрещиваний приведено в Приложении к статье.

Влияние активации *eGFP* на разных стадиях развития на *транс*-инактивацию, регистрируемую у взрослых мух. Для исследования зависимости степени *транс*-инактивации *eGFP* от уровня его экспрессии на разных стадиях развития было проведено скрещивание *w^{*}; UAS-eGFP; GAL80^{ts} GAL4/TM3 Sb¹ Ser¹* × *w^{*}; In(2)A4/CyO; +/+*. В потомстве от скрещивания появляются мухи четырех генотипов. Мухи *w^{*}; UAS-eGFP/In(2)A4; GAL80^{ts} GAL4/+* (опыт) и *w^{*}; UAS-eGFP/CyO; GAL80^{ts} GAL4/+* (контроль) содержат *GAL4* и *GAL80^{ts}*, и при повышении температуры у них повышается экспрессия *eGFP*. В опыте *UAS-eGFP* подвергается *транс*-инактивации под влиянием *In(2)A4*, в контроле *транс*-инактивация отсутствует. Температуру развития особей варьировали, согласно представленным схемам (таблица и рис. 2, а).

Флуоресценцию *eGFP* в отдельных клетках мальпигиевых сосудов анализировали у двухдневных взрослых самок. Причиной выбора

мальпигиевых сосудов, как объекта исследования, было то, что в мальпигиевых сосудах мозаичный ЭП был хорошо выражен, а морфология ткани (крупные изолированные клетки, формирующие однослойные трубки) существенно облегчала количественные измерения.

У мух w^* ; $UAS-eGFP/In(2)A4$; $TM3 Sb^1 Ser^1/+$ и w^* ; $UAS-eGFP/CyO$; $TM3 Sb^1 Ser^1/+$ отсутствует

активатор GAL4, и $eGFP$ экспрессируется на уровне фона. Сравнение экспрессии $eGFP$ при *транс*-инактивации ($UAS-eGFP/In(2)A4$) и без нее ($UAS-eGFP/CyO$) при разных температурах позволяет оценить влияние температуры непосредственно на *транс*-инактивацию.

Измерения уровня флуоресценции $eGFP$ в клетках мальпигиевых сосудов. Изображения

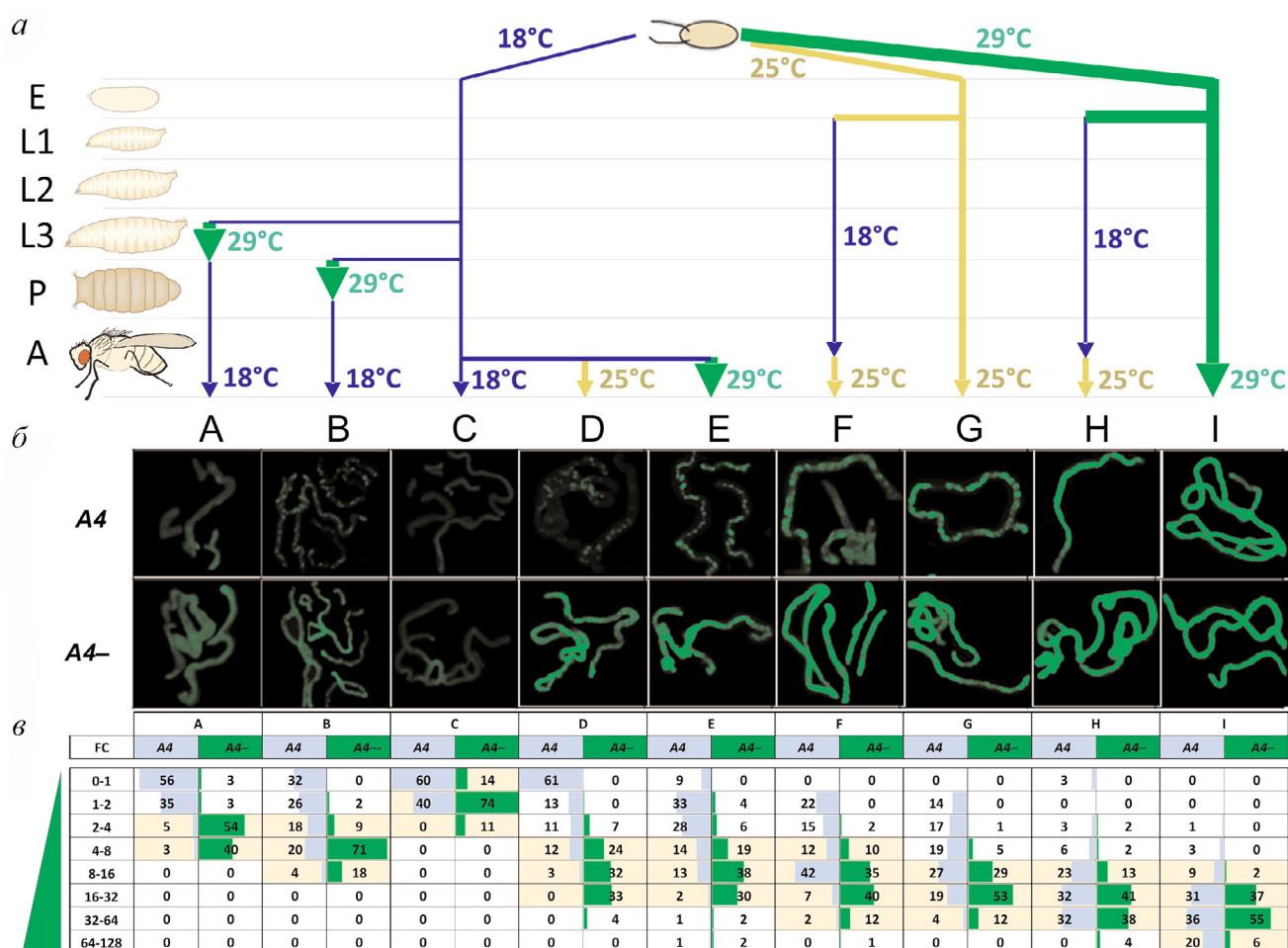


Рис. 2. Транс-инактивация репортерного гена $UAS-eGFP$ у взрослых мух после модуляции его экспрессии на разных стадиях развития. **а** – Схема вариантов температурных воздействий (от А до I) (см. также таблицу) в ходе развития мух $eGFP/A4$; $GAL80^{ts} GAL4/+$ ($A4$, транс-инактивация) и $eGFP/CyO$; $GAL80^{ts} GAL4/+$ ($A4-$, контроль). Е – эмбрионы, L1–L3 – личинки возрастов 1–3, Р – куколки, А – взрослые мухи. **б** – Флуоресценция $eGFP$ в мальпигиевых сосудах мух с хромосомой $A4$ и без нее ($A4-$, контроль). В вариантах В и D–G ($A4$) заметна существенная неравномерность флуоресценции от клетки к клетке, отражающая гетерохроматиновую транс-инактивацию. **в** – Распределение интенсивностей флуоресценции $eGFP$ в клетках мальпигиевых сосудов у мух с транс-инактивацией ($A4$) и в контроле ($A4-$). Измеряли интенсивность флуоресценции в каждой клетке мальпигиевого сосуда и нормировали на модальный (встречающийся чаще всего) уровень флуоресценции в мальпигиевых сосудах мух $A4-$ при 18 °С, принятый за единицу (столбец С, $A4-$). Полученные значения (FC, fold change) показывают во сколько раз уровень флуоресценции выше принятого за единицу. Весь диапазон уровней флуоресценции был разбит на поддиапазоны (указаны в крайнем левом столбце), и для каждого варианта обработки подсчитан процент клеток, попадающий в поддиапазон (цифры в ячейках). Желтым цветом выделен диапазон флуоресценции, в который попадает большинство клеток мальпигиевых сосудов у мух без транс-инактивации ($A4-$), т.е. нормальное значение флуоресценции при данном варианте температурной обработки. Величины достоверности различий между уровнями флуоресценции в каждом из вариантов (Р-величины) представлены в табл. S1 в Приложении, значения погрешностей – в табл. S2 и на рис. S1 в Приложении. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Измерение температуры развития, T °C

Вариант	Стадия						
	Эмбрион 0–24 ч	Личинка L1–L3	Личинка перед окукливанием 24 ч	Куколка 0–24 ч	Куколка 2 дня → вылупление	Взрослые 2 дня	Взрослые 48–72 ч
A	18	18	29	18	18	18	18
B	18	18	18	29	18	18	18
C	18	18	18	18	18	18	18
D	18	18	18	18	18	18	25
E	18	18	18	18	18	18	29
F	25	18	18	18	18	18	25
G	25	25	25	25	25	25	25
H	29	18	18	18	18	18	25
I	29	29	29	29	29	29	29

Использованные варианты изменений температуры на разных стадиях развития особей (к рис. 1). Пример (вариант B): развитие при 18 °C до окукливания, куколки развивались сутки при 29 °C, далее развитие продолжалось при 18 °C до взрослых двухдневных мух, у которых в клетках мальпигиевых сосудов оценивали уровни флуоресценции. L1–L3 – период личиночного развития (личинки первого, второго и третьего возраста).

мальпигиевых сосудов (рис. 2, б) были получены с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM6000 («Leica Microsystems», ФРГ), оснащенного камерой ORCA ER («Hamamatsu Photonics», Япония) и набором фильтров для детекции флуоресценции. Мальпигиевые сосуды извлекали в PBT (1× PBS с 0,1% (v/v) Tween 20), инкубировали в PBT с DAPI 15 мин при комнатной температуре и фотографировали. Все изображения получены при увеличении 5× и при одинаковых параметрах съемки (экспозиция, степень усиления, разрешение), экспозицию подбирали, избегая насыщения изображения на наиболее ярких образцах. Съемку проводили в каналах для GFP (488 нм) и DAPI (405 нм), изображения сохраняли в виде 16bit TIFF и обрабатывали в программе ImageJ, загружая изображения сосуда в каналах DAPI и GFP. Изображение ядер (DAPI) использовали для сегментации изображения (Инструмент Threshold). Полученный набор областей интереса (ROI) переносили на изображение с eGFP, для вычитания фона выделяли область, не содержащую объектов. Для набора областей измеряли площадь, модальную величину плотности изображения (значение, наблюдаемое в большинстве клеток), а также стандартное отклонение интенсивности пикселей в области и ее сферичность (Инструмент MultiMeasure в ImageJ). Полученные данные переносили в Excel, где проводили фильтрацию записей по площади (30–300 пикселей), величине стандартного отклонения (не более интенсивности области) и сферичности (>0,2). В итоге для каждого изображения было получе-

но ~100 записей измерений флуоресценции eGFP, соответствующих отдельным клеткам. Полученные результаты использовали для построения гистограмм распределений интенсивности флуоресценции eGFP и подсчета статистики в программах MS Excel и R (<https://cran.r-project.org/>). Результаты получены для двух независимых скрещиваний, для каждого генотипа и варианта температурной обработки анализировали 5–10 мух.

Количественная ПЦР. Выделение РНК из взрослых мух *w**; *UAS-eGFP/In(2)A4*; *GAL80^{ts} GAL4/+* (опыт), *w**; *UAS-eGFP/CyO*; *GAL80^{ts} GAL4/+* (контроль), *w**; *UAS-eGFP/In(2)A4* (исследование влияния температуры выращивания непосредственно на *транс*-инактивацию), обратную транскрипцию и количественную ПЦР с праймерами к гену *eGFP* проводили, как описано ранее [11]. Количество мРНК *eGFP* нормировали на количество мРНК гена домашнего хозяйства *Rpl32*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованная в работе репортерная конструкция не содержит каких-либо функциональных элементов кроме *UAS-eGFP*, который без трансактиватора *GAL4* экспрессируется на низком уровне на всех стадиях развития мухи. Экспрессию *UAS-eGFP* можно менять при помощи активатора транскрипции *GAL4* и его термочувствительного репрессора *GAL80^{ts}* [11]. Трансактиватор *GAL4* и репрессор *GAL80^{ts}* на-

ходятся под контролем промоторов повсеместно активного альфа-тубулина, поэтому экспрессируются на сходном высоком уровне на всех стадиях развития. Репрессор GAL80^{ts} блокирует активаторный домен GAL4 при 18 °C, но разрушается при повышении температуры, освобождая активатор GAL4 и приводя к увеличению экспрессии *eGFP* [13]. Понижение температуры приводит к накоплению активной формы GAL80^{ts}, выключению GAL4 и понижению уровня экспрессии репортера. Процесс активации репортерного гена не требует запуска экспрессии GAL4, а определяется межбелковыми взаимодействиями GAL4 и GAL80^{ts}, уже присутствующих в клетках. Таким образом, комбинация воздействия GAL4 и GAL80^{ts} позволяет предсказуемо регулировать уровень экспрессии гена путем изменения температуры [11]. Использование *eGFP* в качестве репортерного гена позволяет наблюдать эффект положения *in vivo*, а измерение относительного уровня флуоресценции *eGFP* является прямым методом оценки уровня экспрессии и в целом коррелирует с количеством его мРНК (рис. S1 в Приложении). Проведенные ранее измерения количества мРНК *eGFP* при помощи ПЦР показали, что в образцах РНК из целых взрослых мух экспрессия репортерного гена при 18 °C возрастает в ~3 раза, при 25 °C — в ~50 раз и при 29 °C — в ~100 раз относительно мух без источника GAL4 (уровень фона) [11]. Уровни активации транскрипции *eGFP* при разных температурах у взрослых мух и на стадии эмбрионов сходны (неопубликованные данные). Экспрессия *eGFP* при 18 °C обозначается далее как слабая (~3 раза), при 25 °C — как умеренная (~50 раз) и при 29 °C — как сильная (~100 раз).

Использованная в работе генетическая система с рекомбинантной хромосомой 3, несущей оба регуляторных трансгена, представлена на рис. 1. У мух генотипа *UAS-eGFP/A4; GAL4 GAL80^{ts}/+ (eGFP/A4)* репортерный ген *транс*-инактивируется под влиянием инверсии *A4*, а мухи *UAS-eGFP/CyO; GAL4 GAL80^{ts}/+ (eGFP/+)*, лишённые хромосомы *A4*, служат контролем. В мальпигиевых сосудах взрослых мух *транс*-инактивация проявляется в появлении клеток со сниженным уровнем или отсутствием флуоресценции *eGFP* (рис. 2, б, варианты В, D–G).

Представляло интерес оценить устойчивость эпигенетического наследования состояния экспрессии гена, испытывающего гетерохроматинизацию, индуцированную гомологичной перестроенной хромосомой *A4*. Мы исследовали, как степень *транс*-инактивации у взрослых мух может зависеть от уровня экспрессии репортера (слабая, умеренная и сильная) на более ранних

стадиях развития, начиная с эмбриональной. Степень *транс*-инактивации репортера оценивали по уровню флуоресценции *eGFP* в отдельных клетках мальпигиевых сосудов взрослых мух при изменении уровня экспрессии репортера на разных стадиях развития. Общая схема вариантов температурных воздействий (варианты A–I) в ходе развития представлена на рис. 2, а и в таблице, а визуальная и количественная оценки интенсивности флуоресценции представлены, соответственно, на рис. 2, б и в. Значения R-величин при попарном сравнении распределений интенсивностей флуоресценции и стандартные отклонения уровней флуоресценции между экспериментами приведены в табл. S1 и S2 и на рис. S2 в Приложении.

Для количественной оценки степени *транс*-инактивации уровни флуоресценции в отдельных клетках мальпигиевых сосудов в опыте (мухи *UAS-eGFP/A4*, *A4* на рис. 2, б, в) и контроле (мухи *UAS-eGFP/CyO*, *A4*— на рис. 2, б, в) были измерены и нормированы на принятый за единицу модальный (встречающийся чаще всего) уровень флуоресценции в мальпигиевых сосудах контрольных мух, развивавшихся при 18 °C (вариант С, *A4*—). Полученная величина показывает, во сколько раз уровень флуоресценции в образце больше принятого за единицу. На основании полученных данных для всех вариантов температурных обработок для опыта и контроля были построены гистограммы, отражающие процент клеток образца, попадающих в заданные диапазоны интенсивности флуоресценции. К примеру, в случае D (рис. 2, в) контрольные и опытные мухи развивались до взрослой стадии при 18 °C (слабая активация *eGFP*), затем у взрослых особей репортер был умеренно активирован при 25 °C перед измерением флуоресценции. При этом, при *транс*-инактивации (D, столбец *A4*) 61% клеток имеет уровень флуоресценции меньше или равный принятому за единицу, тогда как в контроле без *транс*-инактивации (D, столбец *A4*—) 89% клеток показывают уровень экспрессии, превышающий принятый за единицу, в 4–32 раза. Распределения интенсивностей флуоресценции в опыте и контроле практически не перекрываются, это пример сильной *транс*-инактивации под влиянием инверсии *A4*.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие заключения. Низкий уровень экспрессии репортера на ранних стадиях развития сопровождается его сильной *транс*-инактивацией у взрослых мух (варианты A–D), во всех случаях обнаруживается популяция клеток с флуоресценцией *eGFP* на уровне фона. При умеренной и сильной активации экспрессии на

стадии эмбриона у взрослых мух отсутствуют клетки с флуоресценцией *eGFP* на уровне фона (варианты **F–I**). При умеренной экспрессии в течение всего развития (25 °C, вариант **G**) ~45% клеток показывают *транс*-инактивацию *eGFP*, их уровень флуоресценции ниже минимального уровня флуоресценции в контроле. Сильная экспрессия *eGFP* в течение всего развития препятствует *транс*-инаktivации в основной массе клеток, распределение уровней флуоресценции в опыте и контроле достоверно не отличаются (вариант **I**). Однако ~10% клеток содержат *транс*-инаktivированный репортер и, что неожиданно, в ~10% клеток мух *UAS-eGFP/A4* уровень флуоресценции превышает максимальный уровень флуоресценции в контроле. Репрессированное состояние репортерного гена, установившееся на ранних стадиях развития, может быть преодолено путем сильной активации транскрипции. Так, в варианте **D** *eGFP* слабо экспрессируется на протяжении всего развития (18 °C) и затем умеренно активируется у взрослых мух (25 °C), тогда как в варианте **E** у взрослых мух репортер активируется сильно (29 °C). В итоге в случае **E** обнаруживается лишь девять процентов клеток с полной репрессией репортера по сравнению с вариантом **D**, где число таких клеток достигает 60%. Иными словами, при сильной активации транскрипции у взрослых мух до 80% клеток с *транс*-инаktivированным *eGFP* начинают его активно экспрессировать (рис. 2, в, вариант **E**). При этом уровень флуоресценции в случае **E** у мух с *транс*-инаktivацией был в целом ниже контрольного (*A4*–).

Сравнение вариантов развития **D**, **F** и **H** показало, что активация репортера на стадии эмбрионов приводит к формированию устойчивого в развитии активного эпигенетического импринтинга в присутствии хромосомы *A4*. На стадии эмбриона в варианте **D** *eGFP* активировался слабо (18 °C), в варианте **F** – умеренно (25 °C) и в варианте **H** – сильно (29 °C). Дальнейшее развитие во всех случаях проходило при 18 °C (слабая экспрессия репортера) вплоть до вылупления, после чего экспрессию репортера умеренно активировали (25 °C) для анализа степени *транс*-инаktivации. Оказалось, что доли клеток мальпигиевых сосудов, в которых *eGFP* был репрессирован, существенно различались между вариантами. В случае **D** наблюдается сильный эффект положения (85% клеток с нарушенной активацией репортера), в случае **F** репрессию демонстрируют ~ 40% клеток, а в случае **H** – только 12% клеток. Сравнение вариантов **D**, **F** и **H** показывает, что для поддержания активного состояния хроматина (устойчивости к *транс*-инаktivации) до стадии взрослых мух необхо-

дим высокий уровень экспрессии именно на эмбриональной стадии развития, тогда как на постэмбриональных стадиях активная транскрипция репортера необязательна.

Хорошо известно, что степень выраженности гетерохроматинового эффекта положения, как правило, снижается при повышении температуры в процессе развития [1, 3]. Поскольку в исследуемой нами системе уровень экспрессии репортерного гена регулировали путем изменения температуры, то такое воздействие могло влиять на степень *транс*-инаktivации непосредственно, а не только через активацию экспрессии репортера с участием GAL4. Однако оценка с помощью количественной ПЦР не выявила заметных различий в содержании мРНК *eGFP* у мух *UAS-eGFP/A4*, лишенных источника GAL4 (*UAS-eGFP/A4*; +/+), развивавшихся при 18 °C и 29 °C (рис. S3 в Приложении). Также известно, что при ЭП зависимость репрессии от температуры развития особи варьирует в разных перестройках, иногда влияние температуры отсутствует [3, 15]. Представляется более вероятным, что наблюдаемое нами влияние уровня экспрессии репортерного гена на степень его *транс*-инаktivации обусловлено именно активацией транскрипции с участием GAL4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования репрессии генов при гетерохроматиновом эффекте положения в ходе индивидуального развития были ранее проведены в ряде работ [16–19]. В двух из них [18, 19] изучали поведение репортерной конструкции, содержащей *UAS-eGFP* (а также другие функциональные элементы), под влиянием гетерохроматина, причем в работе Sage et al. [19] исследовали именно *транс*-действующий эффект положения.

В работе Ahmad et al. [18] была использована репортерная конструкция, содержащая гены *GFP* (под контролем *UAS*) и *mini-white*. Конструкция подвергалась ЭП, а экспрессия *GFP* могла быть запущена на разных стадиях развития при помощи источников GAL4 под ткане- или стадия-специфичным промотором. Анализировались глазные имажинальные диски у личинок и глаза взрослых мух. Было показано, что сильная активация экспрессии репортерного гена *GFP* на стадии эмбриона (драйвер GAL4 под актиновым промотором) приводит к супрессии ЭП, однако при активации экспрессии в меньшей степени (GAL4 под контролем слабого, но активного в большинстве тканей и на всех стадиях развития промотора гена *armadillo*, *arm*) эффект положения сохраняется. ЭП наблюдали

также при активации транскрипции на постэмбриональных стадиях развития. Дерепрессию репортерного гена (появление экспрессирующих *GFP* клеток) наблюдали в процессе дифференцировки имагинальных дисков у личинок, причем дерепрессия происходила как в делящихся, так и в уже дифференцированных клетках. Это наблюдение означает, что для реактивации репрессированного при ЭП гена не требуется прохождение клеточного цикла.

В работе Sage et al. [19] была исследована *транс*-инактивация репортерной конструкции, содержащей *UAS-eGFP* и *mini-white*, под влиянием аллеля *Bw^D* на соседней хромосоме. *Bw^D* представляет собой вставку сателлитной ДНК в ген *Brown*. Экспрессию *UAS-eGFP* активировали при помощи источников GAL4 под контролем промоторов разной силы и специфичности (в том числе актина и *arm*, как и в работе Ahmad et al. [18]), а затем анализировали степень *транс*-инактивации репортера в тканях личинок 3 возраста и у взрослых мух. *Транс*-инактивация *UAS-eGFP* в данной работе демонстрировала заметную тканеспецифичность и наблюдалась в тех случаях, когда экспрессия репортерного гена была на низком уровне на стадиях развития, предшествующих исследованным (личинки 3 возраста и взрослые мухи).

Анализ полученных в ранних работах данных позволяет отметить следующие общие особенности проявления инактивации генов, общие для *цис*- и *транс*-действующего гетерохроматинового ЭП в процессе развития. Репрессия при ЭП начинается со стадии гаструляции у эмбрионов. Если ген экспрессируется на высоком уровне, начиная со стадии эмбриона (высокий уровень обеспечивает, к примеру, промотор актина), то такой ген устойчив к ЭП. Если ген экспрессируется, начиная со стадии эмбриона на низком/среднем уровне (уровень промотора *arm*), то он может быть репрессирован. Также репрессируются гены, экспрессия которых включается на постэмбриональных стадиях развития. Ген, репрессированный на ранних этапах развития, может реактивироваться на более поздних стадиях (обычно в ходе метаморфоза). Реактивация не требует прохождения цикла клеточного деления [18, 19].

Используемая нами система позволяла предсказуемо и количественно регулировать уровень экспрессии репортера [11], тогда как источники GAL4, применяемые для активации транскрипции в ранних работах, имели лишь качественно охарактеризованные профили экспрессии в ходе развития в разных типах тканей. Кроме того, *транс*-инактивацию детектировали в одном типе ткани (мальпигиевых сосу-

дах взрослых мух). Мальпигиевые сосуды формируются из эктодермы и мезодермы на стадиях 5–13 развития эмбриона, клеточные деления заканчиваются на стадии 13, далее число клеток не меняется. Мальпигиевые сосуды не подвергаются гистолиту в ходе метаморфоза [20]. Политенные хромосомы в ядрах клеток мальпигиевых сосудов в ходе развития проходят до 8 циклов эндорепликации ДНК без цитокинеза и могут содержать до 256-ти сестринских хроматид [21]. Мальпигиевые сосуды состоят из терминально-дифференцированных клеток и схожи с клетками слюнных желез, но в отличие от последних сохранены у взрослых мух.

Согласно нашим данным, *транс*-инактивация репортерного гена под влиянием инверсии *A4* демонстрирует свойства, обнаруженные в упомянутых выше более ранних работах и отражающие, видимо, характерные черты гетерохроматиновой репрессии в целом. Так, на стадии эмбриона экспрессия *UAS-eGFP* на высоком уровне супрессирует наблюдаемую у взрослых мух *транс*-инактивацию. При 100× повышении экспрессии репортера на стадии эмбриона *транс*-инактивация у взрослых мух достоверно не наблюдалась, но при активации в 30–50 раз репрессия была хорошо выражена. При активации в 100 раз уровень экспрессии *eGFP* составлял ~17% от уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *Rpl32* [11]. Это наблюдение позволяет предполагать, что гены, экспрессирующиеся на сходных или более высоких уровнях на стадии эмбриона, не будут подвергаться гетерохроматиновой репрессии. В двух работах, в которых исследовали уровень транскрипции генов при *цис*-действующем ЭП [9, 22], было обнаружено, что гетерохроматиновой репрессии подвергается лишь несколько генов из десятков, находящихся в области распространения эффекта положения. Достаточно высокий уровень транскрипции этих генов на эмбриональной стадии может служить объяснением этого наблюдения.

В случаях *транс*-инактивации эпигенетический эффект ассоциируется с изменениями внутриядерной локализации репортерного гена. Ранее было показано [7–9, 23], что репрессия сопровождается переносом гена в гетерохроматиновый компартмент ядра, и наоборот, сохранение активного состояния приводит к локализации гена в эухроматине. Локальная активация *UAS-eGFP* может приводить к нарушению спаривания *транс*-инактивируемого района нормальной хромосомы с инверсией и к переносу области расположения репортерного гена в эухроматиновый компартмент ядра. Представляет интерес при помощи FISH-гибридизации сравнить локализацию малоактивного и активированного

в 100 раз репортера в отдельных клетках мальпигиевых сосудов политенных хромосом, демонстрирующих разную степень *транс*-инактивации.

Мы обнаружили, что установившуюся на стадии эмбриона *транс*-инактивацию репортера можно преодолеть сильной активацией транскрипции у молодых взрослых мух (рис. 2, вариант Е, А4). Температурный уровень для активации экспрессии совпадает с тем, который необходим для предотвращения *транс*-инактивации на стадии эмбриона. По-видимому, достигается пороговый уровень экспрессии репортера, при котором гетерохроматинизированное состояние в районе гена становится нестабильным, не формируется у эмбрионов и разрушается у взрослых мух. Так как мальпигиевые сосуды представляют собой неделимую терминально дифференцированную ткань, то изменение организации хроматина/положения в ядре репортера при реактивации достигается без прохождения клеточного деления и в политенизированных ядрах.

При сильной активации репортера на протяжении всего развития (29 °C) на фоне инверсии А4 до ~10% клеток мальпигиевых сосудов демонстрируют уровень флуоресценции более высокий, чем в контроле (рис. 2, вариант I). Это означает, что гетерохроматиновое окружение может поддерживать высокий уровень экспрессии и, более того, усиливать транскрипцию. Представляется, что гетерохроматин не является неспецифическим репрессором эухроматиновых генов — часть из них может вести себя аналогично генам гетерохроматина, демонстрирующим высокий уровень транскрипции именно в гетерохроматиновом окружении. Можно предположить, что гиперактивированные репортерные гены локализуются в гетерохроматиновом компартменте ядра, а по организации хроматина похожи на сильно экспрессирующиеся гетеро-

хроматиновые гены, то есть включают как маркеры гетерохроматина (HP1a и H3K9me2/3), так и маркеры активной транскрипции, например, H3K4me3 [24].

В настоящей работе мы продемонстрировали возможность исследования эпигенетически наследуемых изменений экспрессии генов при гетерохроматиновой *транс*-инактивации в генетической системе, в которой осуществляли контролируемое изменение экспрессии гена-репортера в процессе развития и следили за наследованием этого состояния у взрослых особей, выключая индуктор транскрипции. Обнаружено, что сильная активация экспрессии гена на стадии эмбриона приводит к переключению репрессированного состояния на активное у взрослых мух. Предложенная в работе генетическая система может быть использована для дальнейших исследований гетерохроматинового эффекта положения, включая выявление новых генов, вовлеченных в процессы эпигенетического наследования, а также механизмов установления гетерохроматиновой репрессии.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-20178) в части синтеза генотипов мух с регулируемой *транс*-инактивацией с дальнейшим использованием в исследованиях и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-04-01984 А и № 17-00-00282 КОМФИ) в части молекулярно-биологических экспериментов и биоинформационного анализа полученных данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elgin, S. C., and Reuter, G. (2013) Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017780, doi: 10.1101/cshperspect.a017780.
2. Weiler, K. S., and Wakimoto, B. T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*, *Annu. Rev. Genet.*, **29**, 577-605, doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.003045.
3. Spofford, J. B., (1976) Position-effect variegation in *Drosophila*, in *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic press. p. 955.
4. Csink, A. K., Bounoutas, A., Griffith, M. L., Sabl, J. F., and Sage, B. T. (2002) Differential gene silencing by trans-heterochromatin in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **160**, 257-269.
5. Martin-Morris, L. E., Csink, A. K., Dorer, D. R., Talbert, P. B., and Henikoff, S. (1997) Heterochromatic trans-inactivation of *Drosophila* white transgenes, *Genetics*, **147**, 671-677.
6. Абрамов Ю. А., Кибанов М. В., Гвоздев В. А., Лавров С. А. (2011) Генетический и молекулярный анализы явления *транс*-инактивации генов у *Drosophila melanogaster*, обусловленного эу-гетерохроматиновой перестройкой гомологичной хромосомы, *Доклады Академии Наук*, **437**, 261-265.
7. Thakar, R., and Csink, A. K. (2005) Changing chromatin dynamics and nuclear organization during differentiation in *Drosophila* larval tissue, *J. Cell Sci.*, **118**, 951-960, doi: 10.1242/jcs.01684.
8. Thakar, R., Gordon, G. and Csink, A. K. (2006) Dynamics and anchoring of heterochromatic loci during development, *J. Cell Sci.*, **119**, 4165-4175, doi: 10.1242/jcs.03183.

9. Abramov, Y. A., Shatskikh, A. S., Maksimenko, O. G., Bonaccorsi, S., Gvozdev, V. A., and Lavrov, S. A. (2016) The differences between *cis*- and *trans*-gene inactivation caused by heterochromatin in *Drosophila*, *Genetics*, **202**, 93-106, doi: 10.1534/genetics.115.181693.
10. Shatskikh, A. S., Abramov, Y. A. and Lavrov, S. A. (2017) Trans-inactivation: repression in a wrong place, *Fly (Austin)*, **11**, 96-103, doi: 10.1080/19336934.2016.1225634.
11. Shatskikh, A. S., Olenkina, O. M., Solodovnikov, A. A., and Lavrov, S. A. (2018) Regulated gene expression as a tool for analysis of heterochromatin position effect in *Drosophila*, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 542-551, doi: 10.1134/S0006297918050073.
12. Лавров С. А., Шацких А. С., Кибанов М. В., Гвоздев В. А. (2013) Транскрипционная инактивация генов при эффекте положения у *D. melanogaster* коррелирует на уровне отдельных клеток с их перемещением в гетерохроматиновый компартмент ядра, *Молекулярная биология*, **47**, 1-6.
13. McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., and Davis, R. L. (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*, *Science*, **302**, 1765-1768, doi: 10.1126/science.1089035.
14. Lee, T., and Luo, L. (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis, *Neuron*, **22**, 451-461, doi: 10.1016/s0896-6273(00)80701-1.
15. Lloyd, V. K., Dymont, D., Sinclair, D. A., and Grigliatti, T. A. (2003) Different patterns of gene silencing in position-effect variegation, *Genome*, **46**, 1104-1117, doi: 10.1139/g03-070.
16. Lu, B. Y., Bishop, C. P., and Eissenberg, J. C. (1996) Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing, *EMBO J.*, **15**, 1323-1332.
17. Weiler, K. S., and Wakimoto, B. T. (1998) Chromosome rearrangements induce both variegated and reduced, uniform expression of heterochromatic genes in a development-specific manner, *Genetics*, **149**, 1451-1464.
18. Ahmad, K., and Henikoff, S. (2001) Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*, *Cell*, **104**, 839-847.
19. Sage, B. T., Wu, M. D. and Csink, A. K. (2008) Interplay of developmentally regulated gene expression and heterochromatic silencing in trans in *Drosophila*, *Genetics*, **178**, 749-759, doi: 10.1534/genetics.107.083105.
20. Gautam, N. K., Verma, P., and Tapadia, M. G., (2017) *Drosophila* malpighian tubules: a model for understanding kidney development, function, and disease, in *Kidney Development and Disease*, (R.K. Miller, Editor.), Springer International Publishing: Cham, pp. 3-25.
21. Lamb, M. J. (1982) The DNA content of polytene nuclei in midgut and Malpighian tubule cells of adult *Drosophila melanogaster*, *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, **191**, 381-384, doi: 10.1007/bf00879628.
22. Vogel, M. J., Pagie, L., Talhout, W., Nieuwland, M., Kerkhoven, R. M., and Van Steensel, B. (2009) High-resolution mapping of heterochromatin redistribution in a *Drosophila* position-effect variegation model, *Epigenetics Chromatin*, **2**, 1, doi: 10.1186/1756-8935-2-1.
23. Harmon, B., and Sedat, J. (2005) Cell-by-cell dissection of gene expression and chromosomal interactions reveals consequences of nuclear reorganization, *PLoS Biol.*, **3**, e67, doi: 10.1371/journal.pbio.0030067.
24. Saha, P., Sowpati, D. T. and Mishra, R. K. (2019) Epigenomic and genomic landscape of *Drosophila melanogaster* heterochromatic genes, *Genomics*, **111**, 177-185, doi: 10.1016/j.ygeno.2018.02.001.

THE HIGH LEVEL OF GENE TRANSCRIPTION AT THE EMBRYO STAGE LEADS TO THE SUPPRESSION OF ITS HETEROCHROMATIC *trans*-INACTIVATION IN *Drosophila melanogaster* ADULTS*,**

A. A. Solodovnikov, V. A. Gvozdev, and S. A. Lavrov***

*Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
123182 Moscow, Russia; E-mail: slavrov@img.ras.ru*

Received December 30, 2019

Revised February 24, 2020

Accepted February 24, 2020

The movement of the gene as a result of chromosomal rearrangement from euchromatin to constitutive heterochromatin in some cases is accompanied by epigenetic inactivation of this gene - *cis*-inactivation. In the case of *trans*-inactivation, the transgenes in the normal chromosome are repressed by the *cis*-inactivation-causing homologous rearranged chromosome. *Trans*-inactivation is the result of somatic pairing of homologs and movement of the normal chromosome region into the heterochromatic compartment of the nucleus. Previously, we showed that the degree of *trans*-inactivation of the *UAS-eGFP* reporter gene in adult flies depends on the level of its transcription, which was regulated by temperature changes on the background of GAL4 transcription activator and GAL80^{ts} temperature-sensitive inhibitor presenting in the same genome. In this paper we investigated in detail the epigenetic inheritance of the active/repressed state of the *trans*-inactivated reporter gene at different expression levels by measuring the fluorescence level of eGFP in individual cells of Malpighian tubes in adult flies. It was found that the high level of expression at the embryonic stage protects the eGFP gene from *trans*-inactivation in adults, and the activated state is inherited in the continuation of the entire development and differentiation while the activating effect of GAL4 is turned off.

Keywords: heterochromatin, *Drosophila*, PEV, *trans*-inactivation, expression, GAL4, GAL80^{ts}

УДК 577.151.42/45

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ*

© 2020 О.А. Кладова¹, Д.А. Яковлев¹, Р. Гроисман^{2,3}, А.А. Ищенко^{2,3},
М.К. Сапарбаев^{2,3}, О.С. Федорова^{1,4**}, Н.А. Кузнецов^{1,4**}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;
электронная почта: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

² Groupe "Réparation de l'AND", Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer,
CNRS UMR 8200, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

³ Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

⁴ Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 21.01.2020

После доработки 13.02.2020

Принята к публикации 17.02.2020

Поврежденные азотистые основания ДНК удаляются в процессе эксцизионной репарации оснований. Этот ферментативный процесс начинается с действия одной из ДНК-гликозилаз, которые находят и удаляют поврежденные гетероциклические основания путем гидролиза *N*-гликозидных связей с образованием апуринового/апириимидинового сайта (АР-сайта). Затем апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза APE1 гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АР-сайта с образованием одноцепочечного разрыва в ДНК. Снижение функциональной активности отдельных ферментов BER связано с повышенным риском развития сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. В данной работе проведена разработка и апробация метода флуоресцентного анализа для измерения активности ключевых ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеазы человека в клеточных экстрактах. Эффективность флуоресцентных ДНК-зондов проверяли с помощью очищенных ферментов. Перспективные конструкции зондов были испытаны для определения активности ферментов в экстрактах клеточных линий A549, MCF7, HeLa, WT-7, HEK293T и HNC8. Показано, что общий уровень активности ферментов, отвечающих за репарацию АР-сайтов, удаление урацила и 5,6-дигидроурацила, был выше в линиях раковых клеток по сравнению с нормальной линией клеток почек человека HNC8.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ферментативная активность, флуоресценция, ДНК-зонд, ДНК-гликозилаза, АР-эндонуклеаза.

DOI: 10.31857/S0320972520040089

Окисление, алкилирование, дезаминирование, апуринизация/апириимидинизация, образование разрывов цепей ДНК — это неполный спектр процессов, которые приводят к повреждению структуры ДНК [1–7]. С одной стороны, такие повреждения ДНК могут инициировать

процесс опухолевой трансформации клеток. С другой стороны, этот же спектр повреждений возникает при химио- и лучевой терапии опухолевых заболеваний [8–10]. Поэтому система защиты клетки от повреждений — ферментативная система репарации ДНК выполняет важную роль в протекании процессов образования и деградации новообразований. Многочисленные исследования показали, что активность некоторых ферментов репарации ДНК влияет на токсичность генотоксинов и/или повреждающих факторов, в том числе, используемых в ходе химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний [11, 12]. Также известно, что нарушения работы ферментов репарации ДНК вызывают тяжелые последствия в организме человека и часто ведут к возникновению рака и преждевременному старению [13, 14]. Считается, что главную роль в одном из путей репарации ДНК, экс-

Принятые сокращения: OGG1 — 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; AAG — алкиладенин-ДНК-гликозилаза; APE1 — АР-эндонуклеаза человека; MBD4 — метилцитозин-связывающий домен 4 человека; TDG — тимин-ДНК-гликозилаза; NEIL1 — эндонуклеаза VIII; NTHL1 — эндонуклеаза II; АР-сайт — апуриновый/апириимидиновый сайт; F-сайт — остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана; εА — 1,N⁶-этноаденозин; oхoG — 8-оксогуанозин; DHU — 5,6-дигидроурадин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-017, 16.03.2020.

** Адресат для корреспонденции.

цизионной репарации оснований (BER), играют ДНК-гликозилазы, которые узнают различные модифицированные и неправильно спаренные основания и катализируют их удаление [15, 16]. Затем апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза (AP-эндонуклеаза) удаляет оставшийся фрагмент 2'-дезоксирибозы. Основная задача этих ферментов состоит в том, чтобы быстро и точно определить местоположение модифицированного основания или апуринового/апириимидинового сайта среди огромного количества неповрежденных азотистых оснований и инициировать процесс репарации.

Показано, что клетки и нокаутные животные, лишенные различных ДНК-гликозилаз, становятся более чувствительными к воздействию факторов, приводящих к повреждению ДНК [17–19]. Генно-инженерное удаление из клеток AP-эндонуклеазы приводит к их гибели, что свидетельствует о критической роли этого фермента в процессе восстановления неповрежденной структуры ДНК [20–22].

Необходимо отметить, что в последнее время интенсивно развиваются методы определения активности ферментов репарации в клеточных экстрактах [23–29]. Для определения ферментативной активности ДНК-гликозилаз было предложено несколько различных подходов. Эти подходы обычно связаны с регистрацией флуоресцентного сигнала, генерируемого ДНК-зондами, содержащими поврежденный нуклеотид, который является субстратом для фермента-мишени [30–32]. Как правило, в качестве источников сигнала используются разнообразные флуоресцентные красители, например, взаимодействующие по принципу резонансной передачи энергии флуоресценции (FRET) или изменяющие интенсивность флуоресценции аналоги азотистых оснований, расположенные в одноцепочечных или двухцепочечных ДНК-зондах [33]. Например, в работе [23] используются ДНК-зонды, дополнительно модифицированные биотином для иммобилизации на магнитных наночастицах. Реакционную смесь, содержащую ДНК-зонд и разное количество фермента (AAG и/или APE1), выдерживали 1 ч, после чего регистрировали интенсивность флуоресценции раствора. Авторы [23] подтверждают, что данные наночастицы деградируют со скоростью 2% в сутки. Таким образом, использование таких конструкций осложняется контролем качества данных наночастиц и контролем концентрации флуоресцентного ДНК-зонда на поверхности этих наночастиц. В другой работе [30] для анализа активности ферментов OGG1 и AAG использовали специализированное оборудование, позволяющее регистрировать сигнал на уровне одной молекулы.

Реакционную смесь выдерживали 1,5 ч, а затем по значению флуоресцентного сигнала, возникающего за счет образования продуктов реакции, определяли специфическую активность. Недавно для определения низких концентраций урацил-ДНК-гликозилазы был предложен метод, основанный на использовании терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы, с помощью которой в образце происходило образование флуоресцентных кластеров меди [34]. Были разработаны также другие способы усиления сигнала для определения активности урацил-ДНК-гликозилазы [35–37]. Однако, несмотря на обилие различных вариантов регистрации ферментативной активности в клеточных экстрактах, некоторые упомянутые способы включают в себя выполнение большого количества подготовительных этапов, специализированного оборудования или требуют использования других ферментов, таких как ДНК-полимераза, ДНК-никаза, рибонуклеаза и даже AP-эндонуклеаза.

Кроме того, необходимо отметить, что количественное определение активности ферментов, как правило, основано на сравнении уровня флуоресцентного сигнала в реакционной смеси через определенное время с уровнем сигнала, который получен для очищенного препарата этого же фермента. Однако множественные литературные данные [38–43] свидетельствуют о том, что активность ферментов репарации значительно изменяется при взаимодействии с другими белками и ферментами, которые могут присутствовать в клеточном экстракте и отсутствуют в «калибровочных кривых». Таким образом, одно и то же количество фермента будет приводить к разному изменению флуоресцентного сигнала в контрольной реакционной смеси и клеточном экстракте.

В настоящей работе проведена апробация метода определения активности основных ферментов эксцизионной репарации оснований (ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы человека) в экстрактах различных клеточных линий человека. Основная цель этой работы — это разработка простого в использовании метода измерения активности ферментов BER в клеточных экстрактах. Преимущество представленного FRET-анализа перед другими заключается в простоте, основанной на использовании небольшого количества клеток и синтетического FRET-меченого ДНК-дуплекса, содержащего специфический поврежденный нуклеотид. Новизна данной работы заключается в анализе не только амплитуды изменения сигнала через определенное время, но и скорости расщепления ДНК-зонда.

В ходе работы был синтезирован ряд флуоресцентных ДНК-зондов, содержащих в качестве повреждения такие нуклеотиды, как F-сайт,

Таблица 1. Последовательность ДНК-зондов, использованных в работе, содержащих специфическое повреждение для различных ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеазы

Целевой фермент	Поврежденный нуклеотид	Последовательность ДНК-зонда
APE1	F	5'-FAM- GCTCA(F)GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT(G)CATGTCTCGAC-5'
OGG1	oxoG	5'-FAM-GCTCA(oxoG)GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT (C) CATGTCTCGAC-5'
UNG2, SMUG1, MBD4, TDG	U	Тип I 5'-FAM-GCTCA(U)GTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGT(G)CATGTCTCGAC-BHQ1-5'
		Тип II 5'-FAM-GCTCA(U)GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT(G)CATGTCTCGAC-5'
NEIL1, NTHL1	DHU	5'-FAM-GCTCA(DHU)GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT (G) CATGTCTCGAC-5'
AAG	εA	5'-FAM-GCTCA(εA)GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT (T)CATGTCTCGAC-5'
Неспецифическое расщепление	C	5'-FAM-GCTCA(C)GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT(G)CATGTCTCGAC-5'

Примечание. FAM — остаток 6-карбоксифлуоресцеина, BHQ1 — тушитель флуоресценции «black hole quencher».

5,6-дигидроуридин (DHU), 1, N⁶-этенoadенозин (εA), 8-оксогуанозин (oxoG) и уридин (табл. 1). Эффективность данных зондов определена с помощью очищенных препаратов нескольких ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеазы человека. Перспективные конструкции были использованы для определения активности ферментов в экстрактах клеточных линий A549, MCF7, HeLa, WT-7, НЕК293Т и НКС8. В качестве контроля неспецифического расщепления ДНК-зондов использовали дуплекс, не содержащий поврежденных нуклеотидов, что позволило оценить устойчивость используемых зондов к неспецифическим эндо- и экзонуклеазам в клеточных экстрактах. Было показано, что флуоресцентные ДНК-зонды можно использовать для измерения активности нескольких ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеазы АРЕ1 человека. Чувствительность анализа позволяет измерить активность некоторых ферментов в экстракте, содержащем 10⁶ клеток. Анализ различных раковых и нерасковых клеточных линий выявил различия в активности ключевых ферментов BER.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Структура ДНК-зондов. ДНК-зонды содержали FRET-пару красителей FAM/BHQ1 и поврежденный нуклеотид, обеспечивающий специ-

фичность к определенному ферменту или группе ферментов (табл. 1). При удалении поврежденного азотистого основания, входящего в состав ДНК-зонда, происходит либо образование АР-сайта (в случае действия монофункциональных ДНК-гликозилаз, таких как UNG2, SMUG1, MBD4, TDG и AAG), либо образование разрыва в цепи, содержащей повреждение (в случае действия бифункциональных ДНК-гликозилаз, таких как OGG1, NEIL1 и NTHL1). Фермент АРЕ1 также образует одноцепочечный разрыв в цепи, содержащей F-сайт. После образования разрыва происходит плавление коротких участков ДНК-продукта и пространственное отдаление FRET-красителей FAM и BHQ1 друг от друга, что приводит к значительному росту флуоресцентного сигнала FAM.

Клеточные линии. Для анализа активности ферментов репарации ДНК с помощью ДНК-зондов использовали клетки человека различных линий: A549, HeLa, MCF7, WT-7, НЕК293Т и НКС8 (табл. 2). Клетки линий НЕК293Т, A549, WT-7, HeLa, НКС8 культивировали в среде DMEM («Gibco», «ThermoFisher Scientific», США), клетки линии MCF7 культивировали в среде RPMI-1640 («Gibco», «ThermoFisher Scientific») с 10%-ной фетальной сывороткой теллят («Gibco», «Thermo FS»), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °C.

Клетки механически снимали с поверхности культурального флакона, осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 2 мин), ресуспендировали в растворе PBS и также осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 2 мин). Данную процедуру повторяли два раза.

Подсчет клеток проводили, используя автоматический счетчик клеток Countess II Automated Cell Counter («Thermo FS»). Для этого 10 мкл клеточной суспензии смешивали с 10 мкл трипанового синего, 10 мкл смеси помещали в кассету для подсчета клеток (Bio-Rad, США).

Подготовка клеточного экстракта. Для анализа активности ферментов репарации ДНК использовали 1×10^6 клеток. Лизис клеток проводили в CHAPS буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,5%-ный CHAPS, 10%-ный глицерин, 0,1 mM PMSE, 0,5 mM β -меркаптоэтанол). Общую концентрацию белка измеряли по методу Бредфорда (концентрация белков, как правило, составляла 1–2 мкг/мкл). Клеточный экстракт хранили при -80°C и размораживали непосредственно перед работой.

Определение активности ферментов в клеточном экстракте. Пробы готовили в 100 мкл буферного раствора (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 7%-ный глицерин), содержащего 70 мкл экстракта клеток. ДНК-зонд, содержащий определенный тип поврежденного нуклеотида (табл. 1), добавляли к клеточному экстракту до конечной концентрации 1 мкМ. После быстрого перемешивания ДНК-зонда и клеточного экстракта проводили регистрацию FRET-сигнала, используя прибор FLUOstar Omega («BMG Labtech», Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла $\lambda_{\text{ex}} = 485$ нм, регистрацию эмиссии проводили на длине волны $\lambda_{\text{em}} = 520$ нм. Максимальное время реакции составляло 2000 с, температура 37°C . Каждый эксперимент проводили трижды. Амплитуду FRET-сигнала после инкубирования реакционной смеси в течение 2000 с использовали для определения относительной активности ферментов в разных клеточных линиях.

Кинетический анализ рекомбинантных ферментов методом «остановленного потока». Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие рекомбинантных ферментов с ДНК-зондом, были получены на спектрометре остановленного потока SX.18MV («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) с регистрацией FRET-сигнала, как описано ранее [44–47]. Длина волны возбуждения флуоресценции FAM составляла $\lambda_{\text{ex}} = 494$ нм, и регистрацию FRET-сигнала проводили при $\lambda_{\text{em}} > 515$ нм с использованием

Таблица 2. Клеточные линии человека, использованные в работе

Название	Происхождение клеточной линии
A549	карцинома легкого
HeLa	карцинома шейки матки
MCF7	карцинома молочной железы
WT-7	карцинома почки
HEK293T	эмбриональные клетки почки
HKC8	клетки почки

светофильтра OG-515 («Schott», Германия). Все эксперименты проводили при 25°C в буфере, состоящем из 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 1,0 mM ЭДТА, 1,0 mM ДТТ, 5,0 mM MgCl₂ и 7%-ного глицерина.

Раствор, содержащий ДНК-гликозилазы или смесь ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы в буфере, быстро смешивали в реакционной камере с раствором ДНК-зонда. Мертвое время прибора – 1,4 мс. Концентрация ферментов и ДНК-зонда составляла 1,0 мкМ во всех экспериментах. Указанные концентрации реагентов соответствуют концентрациям в реакционной кювете после смешивания. Как правило, каждую кинетическую кривую, представленную на рисунках, воспроизводили несколько раз. Измерение FRET-сигнала характеризует изменение расстояния между красителем FAM и тушителем BHQ1 как в процессе конформационных изменений ДНК-зонда при образовании каталитического комплекса фермент–ДНК, так и при последующем расщеплении ДНК и диссоциации комплекса фермент–продукт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для регистрации каталитической активности ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы были разработаны ДНК-субстраты, несущие поврежденный нуклеотид, обеспечивающий специфичность к данному ферменту и FRET-пару красителей на концах дуплекса. Для оценки чувствительности использовали два типа ДНК-субстратов (рис. 1): тип I ДНК-субстратов (рис. 1, а) содержал красители FAM и BHQ1 на 5'-концах олигонуклеотидов, а тип II ДНК-субстратов (рис. 1, б) содержал FAM на 5'-конце и BHQ1 на 3'-конце олигонуклеотидов, формирующих дуплекс.

Необходимо отметить, что анализ активности монофункциональных ДНК-гликозилаз, образующих в ДНК-дуплексе AP-сайт, представ-

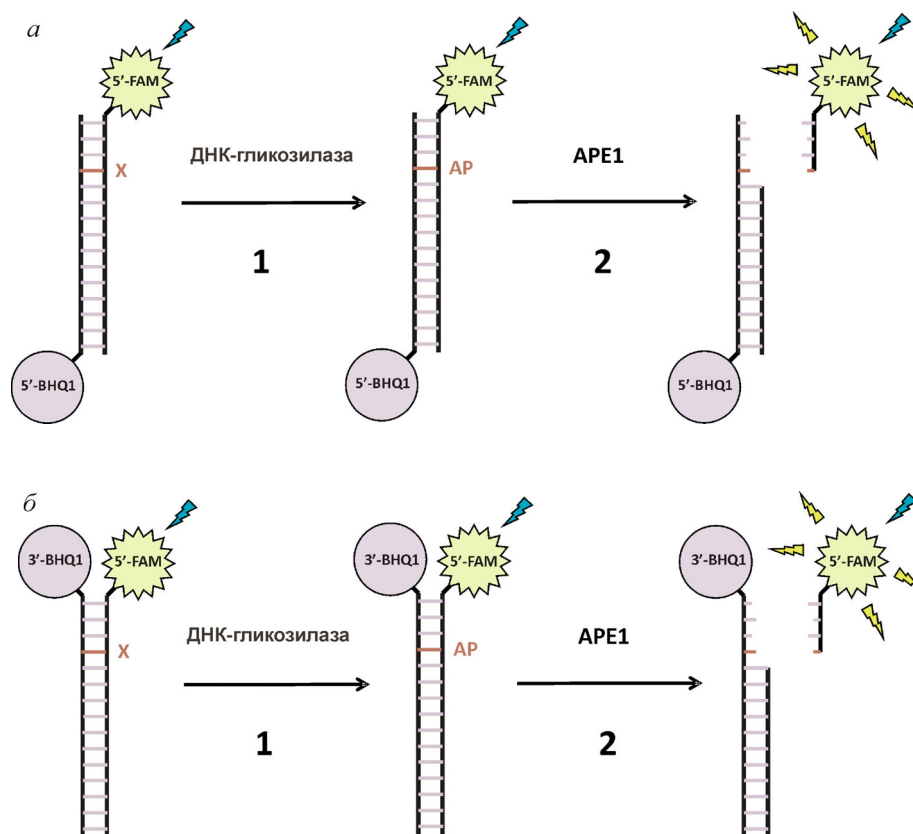


Рис. 1. Принципиальная схема анализа процессов взаимодействия монофункциональных ДНК-гликозилаз с модельными FRET-субстратами: (а) тип I, (б) тип II. Стадия 1 – удаление поврежденного основания X и образование AP-сайта. Стадия 2 – расщепление AP-сайта АР-эндонуклеазой АРЕ1, которое ведет к пространственному отдалению флуорофора FAM и тушителя BHQ1 и значительному росту FRET-сигнала. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ляет нетривиальную задачу по сравнению с бифункциональными ДНК-гликозилазами и АР-эндонуклеазой, которые формируют одноцепочечный разрыв в модельном ДНК-субстрате. Поэтому чувствительность обоих типов ДНК-субстратов была проанализирована при использовании монофункциональных ДНК-гликозилаз MBD4 и TDG (рис. 2). Взаимодействие MBD4 и TDG с модельными дуплексами, содержащими в качестве повреждения уридин, приводило к удалению урацила и образованию AP-сайта (рис. 1, стадия 1), этот процесс сопровождается медленным ростом FRET-сигнала (рис. 2, а). Сравнение кинетических кривых с ранее полученными данными для MBD4 показывает, что медленный рост FRET-сигнала в интервале времени 100–3000 с совпадает с медленным накоплением продуктов реакции и, по-видимому, характеризует скорость-лимитирующую стадию диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции, содержащим AP-сайт [48].

Второй тип ДНК-субстрата (рис. 1, б), содержащий красители на одном конце ДНК-дуплекса, обладал большей амплитудой изменения FRET-сигнала и, соответственно чувствительностью, при взаимодействии с MBD4 и TDG. Поэтому в последующих экспериментах с участием АР-эндонуклеазы АРЕ1 использовали этот модельный субстрат. Взаимодействие MBD4 и TDG с данным субстратом в присутствии АРЕ1 приводило к значительному ускорению и примерно двукратному увеличению амплитуды фазы роста FRET-сигнала (рис. 2, б), что свидетельствует об образовании одноцепочечного разрыва по AP-сайту, катализируемого АР-эндонуклеазой. Кроме того, ранее было показано, что АР-эндонуклеаза АРЕ1 стимулирует активность ДНК-гликозилаз в условиях множественного оборота фермента [38–43]. Таким образом, присутствие АР-эндонуклеазы в реакционной смеси позволяет увеличить амплитуду изменений FRET-сигнала при взаимодействии с монофункциональными ДНК-гликозилазами и по-

высить чувствительность модельного субстрата к данным ферментам. На основании полученных данных далее в работе с клеточными экстрактами использовали ДНК-субстраты типа II.

Полученные данные показывают, что в случае ДНК-зонда типа I чувствительность к расщеплению ДНК невысока, но все же достаточна для обнаружения этого процесса *in vitro*. Однако даже такая низкая чувствительность позволяет регистрировать процесс образования AP-сайта, который сопровождается увеличением гибкости дуплекса ДНК после удаления урацила монофункциональными ДНК-гликозилазами и уменьшением расстояния между красителями. ДНК-зонд типа II обладает более высокой чувствительностью к расщеплению ДНК из-за более короткого расстояния между флуорофором и тушителем. Кроме того, в случае одновременного действия ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы, который реализуется в клеточном экстракте, амплитуда изменения FRET-сигнала дополнительно увеличивается ~ в 2 раза (рис. 2, б). Поэтому для оценки ферментативной активности в клеточных экстрактах, в которых присутствуют оба фермента, были выбраны более чувствительные ДНК-субстраты типа II.

Для определения активности определенных ферментов репарации были использованы ДНК-субстраты типа II, содержащие определенный поврежденный нуклеотид (табл. 1). В качестве поврежденных нуклеотидов были выбраны модификации, возникающие при окислительном стрессе (8-оксогуанозин и 5,6-дигидроуридин), дезаминировании (уридин), алкилировании (1, N6-этенoadенозин) и апуринизации/апириминидации (AP-сайт). Набор ДНК-зондов, содержащих эти повреждения, позволил охарактеризовать активность всех ключевых ферментов репарации человека. Для определения активности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 использовали ДНК-зонд, содержащий остаток 8-оксогуанозина (охоG-зонд). Для исследования ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, специфически узнающих урацил в ДНК, в составе ДНК-зондов присутствовал уридин (U-зонд), для ДНК-гликозилаз NEIL1 и NTHL1 ДНК-зонд содержал остаток 5,6-дигидроуридина (DHU-зонд), а для алкиладенин-ДНК-гликозилазы AAG в составе ДНК-дуплексов был остаток 1, N6-этенoadенозина (εA-зонд). ДНК-зонд, содержащий в составе аналог AP-сайта — остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана (F-зонд), являлся субстратом для AP-эндонуклеазы APE1. Поскольку в общих

клеточных экстрактах содержатся экзо- и эндо-нуклеазы, которые могут неспецифически гидролизовать ДНК-зонд, для контроля такого расщепления использовали ДНК-дуплекс, не содержащий поврежденных нуклеотидов в своей структуре (С-зонд) (табл. 1).

Для анализа активности ферментов репарации ДНК с помощью ДНК-зондов были выбраны клетки опухолевых линий человека различного гистологического происхождения (табл. 2). Все подготовленные образцы содержали клеточный экстракт и ДНК-зонд с определенным поврежденным нуклеотидом. На рис. 3 приведены кинетические кривые изменения

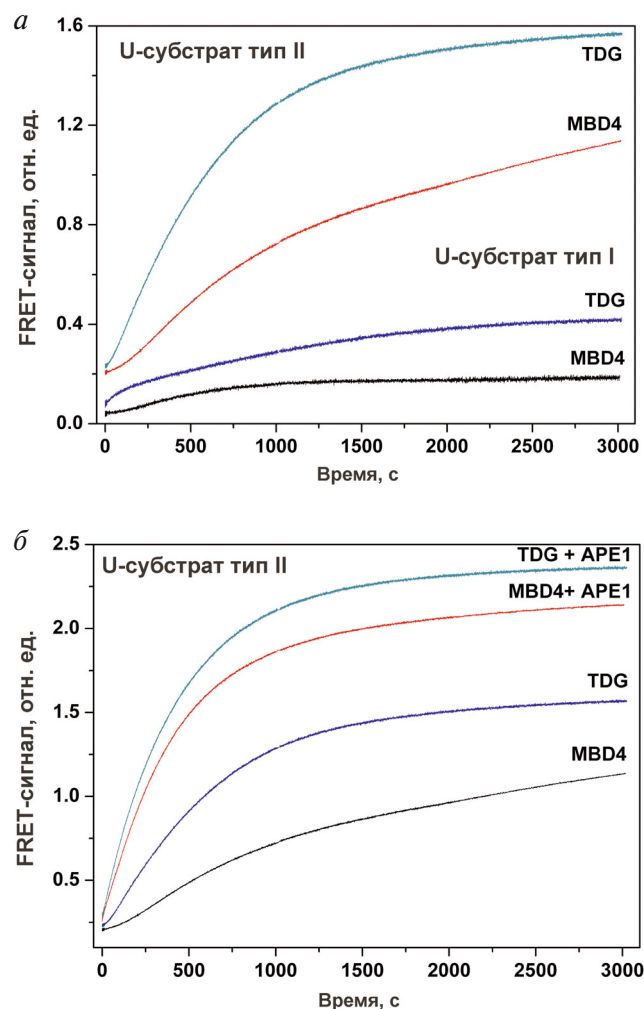


Рис. 2. Кинетические кривые изменения FRET-сигнала при взаимодействии MBD4 и TDG с модельными ДНК-субстратами типа I и типа II, содержащими в качестве повреждения уридин. *a* – Сравнение чувствительности ДНК-субстратов типа I и типа II при взаимодействии с MBD4 и TDG; *б* – влияние AP-эндонуклеазы APE1 на взаимодействие MBD4 и TDG с U-субстратом типа II. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

FRET-сигнала, соответствующие расщеплению ДНК-зондов в клеточном экстракте каждой линии. Для всех линий клеток расщепление ДНК-зондов, содержащих F-сайт, уридин и 5,6-ди-

гидроуридин, проходило до 2000 с и сопровождалось значительным ростом амплитуды FRET-сигнала, характеризующим активность соответствующих ферментов (табл. 1). Необходимо от-

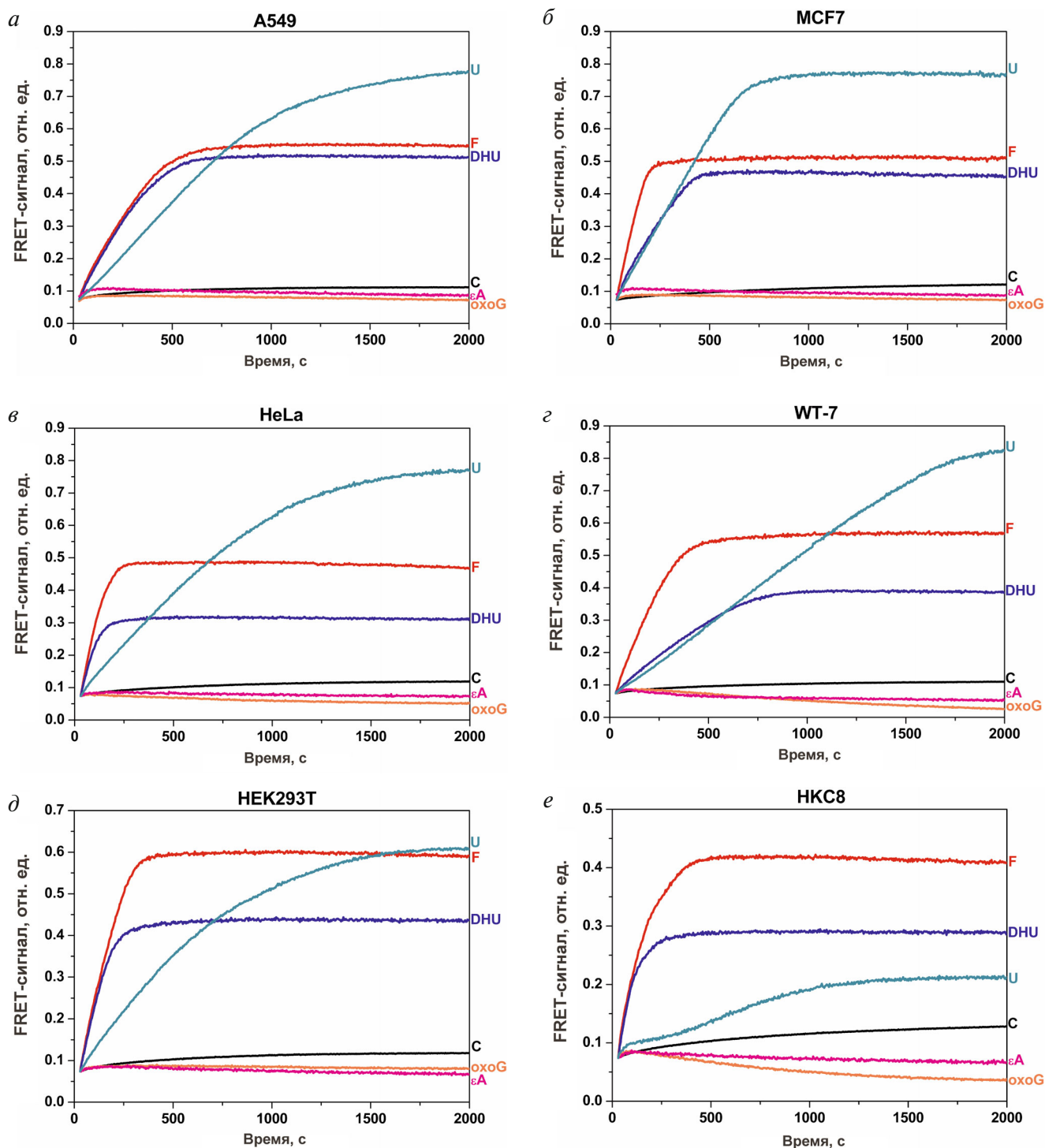


Рис. 3. Изменения FRET-сигнала, характеризующие активность ферментов в клеточных экстрактах линий A549 (а), MCF7 (б), HeLa (в), WT-7 (г), HEK293T (д), HNC8 (е). Буквенное обозначение ДНК-зондов соответствует табл. 1. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

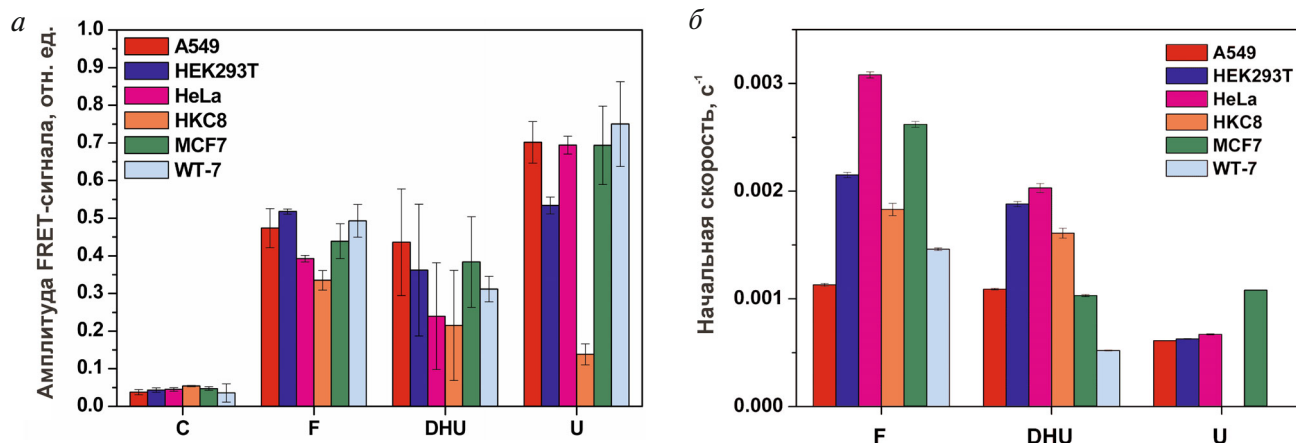


Рис. 4. Относительная активность ферментов репарации в экстрактах клеточных линий A549, MCF7, HeLa, WT-7, HEK293T и HKC8. *a* – Амплитуда изменения FRET-сигнала; *б* – начальная скорость роста FRET-сигнала на кинетических кривых.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

метить, что расщепление неповрежденного дуплекса (С-зонд) сопровождалось небольшим ростом FRET-сигнала, что свидетельствует о значительно более медленном неспецифическом расщеплении ДНК. Для защиты от экзонуклеазного расщепления используют различные подходы: шпилечные структуры, модифицированные концевые нуклеотиды или фосфатные группы. Однако полученные данные свидетельствуют о том, что использование небольшого количества клеток позволяет пренебречь вкладом неспецифического расщепления ДНК-зондов за время проведения анализа. Таким образом, предлагаемый метод определения активности позволил сопоставить специфическое и неспецифическое расщепление и заключить, что в случае F-, U- и DHU-зондов можно пренебречь деградацией ДНК-зонда клеточными нуклеазами и, соответственно, использовать стандартные олигонуклеотиды без введения дополнительных защитных конструкций в структуру ДНК-зонда.

При этом для всех клеточных линий при использовании *охоG*- и *εA*-зондов, расщепляемых ферментами *OGG1* и *AAG*, соответственно, после незначительного роста FRET-сигнала на начальном участке кинетических кривых происходило его уменьшение в диапазоне времени до 2000 с. Такое изменение FRET-сигнала не соответствует модели прямого расщепления ДНК-зонда ни за счет специфического расщепления ферментами *OGG1* и *AAG*, ни за счет неспецифической деградации, так как в обоих случаях такое расщепление должно сопровождаться ростом FRET-сигнала (рис. 1, *б*). Полученные данные могут свидетельствовать как о более

сложных взаимодействиях данных зондов с ферментами, находящимися в клеточном экстракте, так и о том, что концентрация *OGG1* и *AAG* в клеточном экстракте слишком мала для измерения активности этих ферментов в клеточном экстракте, полученном из 10^6 клеток. Таким образом, можно предположить, что в полученных клеточных экстрактах концентрация *OGG1*, единственной ДНК-гликозилазы, которая отвечает за удаление 8-оксогуанина, и *AAG*, единственной ДНК-гликозилазы, которая отвечает за удаление метилированных нуклеотидов, значительно ниже, чем концентрация урацил-ДНК-гликозилаз *UNG2*, *SMUG1*, *MBD4* и *TDG*, а также ДНК-гликозилаз *NEIL1* и *NTHL1*, отвечающих за удаление поврежденных пиримидиновых нуклеотидов.

Для сравнения относительной активности ферментов в клеточных экстрактах разных линий использовали амплитуду изменения FRET-сигнала через 2000 с после начала регистрации. Как видно на рис. 4, *a*, неспецифическое расщепление С-зонда происходит с близкой эффективностью во всех линиях клеток. Более значительный рост FRET-сигнала наблюдался для F-, U- и DHU-зондов. Сравнение амплитуд FRET-сигнала в случае F-зонда выявило небольшие различия между клеточными линиями, не превышающими коэффициент 1,5 (между клеточными линиями HKC8 и HEK293T). Следовательно, этот результат показывает, что уровень активности AP-эндонуклеазы незначительно варьирует среди использованных клеточных линий.

В случае анализа активности *NEIL1* и *NTHL1* с использованием DHU-зонда разли-

чия в амплитудах FRET-сигнала были более значительными и достигли коэффициента 2 при сравнении клеток НКС8 и А549. Анализ суммарной урацил-ДНК-гликозилазной активности, характеризующей концентрацию ферментов UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, выявил пятикратное увеличение амплитуд FRET-сигнала во всех линиях раковых клеток по сравнению с клетками почки человека НКС8. Напротив, уровень урацил-ДНК-гликозилазной активности в эмбриональных клетках почки НЕК293Т был выше, чем в клеточной линии НКС8, только в 3,8 раза. Интересно отметить, что, в целом, уровень репарационной активности для всех ДНК-зондов оказался ниже в клетках линии НКС8.

Для сравнения активности ферментов в различных экстрактах также использовали начальную скорость расщепления ДНК-зондов, которую оценивали как наклон начального участка кинетических кривых (рис. 4, б). Анализ начального участка кинетических кривых может быть выполнен в условиях стационарного протекания процесса расщепления ДНК-зонда. Однако в случае анализа экстракта клеточной линии НКС8 при взаимодействии с ДНК-субстратами, содержащими урацил, изменения FRET-сигнала имели двухфазный характер (рис. 3, е), что не позволило определить начальную скорость расщепления U-зонда. Такое отклонение от стационарного протекания процесса может быть обусловлено сложными белок-белковыми взаимодействиями ферментов, участвующих на начальных этапах пути BER, взаимным влиянием этих ферментов на активность друг друга, а также присутствием в клеточном экстракте нескольких ферментов с одинаковой субстратной специфичностью. Сравнение начальных скоростей расщепления ДНК-зондов во всех остальных случаях показало, что скорость расщепления F-сайта отличается между клеточными линиями не более чем в три раза для клеток А549 и HeLa соответственно. В случае DHU-зонда четырехкратная разница была отмечена между клетками WT-7 и HeLa. Следует отметить, что активность ферментов, катализирующих расщепление F-сайта и DHU в клетках почки человека НКС8, имела среднее значение, по сравнению с опухолевыми линиями. Из-за нестационарной кинетики в случае клеточного экстракта НКС8 с ДНК-зондом, содержащим урацил, наблюдаемая константа скорости расщепления U-зонда не была рассчитана. Тем не менее, различие в активности урацил-ДНК-гликозилаз среди других клеточных линий не превышало коэффициент 2.

В данной работе был апробирован флуоресцентный метод определения активности ключевых ферментов репарации человека в экстрактах клеточных линий НКС8, WT-7, А549, MCF7, НЕК293Т и HeLa. Для этого создан ряд флуоресцентных ДНК-зондов, содержащих различные типы поврежденных нуклеотидов ДНК, в том числе повреждения ДНК, возникающие при химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний. Использование ДНК-зондов позволило оценить относительную активность ряда ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы человека в здоровых клетках и клетках опухолевых линий. Показано, что неспецифическая деградация ДНК-зондов в общем клеточном экстракте происходит значительно медленнее, чем специфическое расщепление ДНК, содержащей поврежденный нуклеотид. При этом уровень активности ферментов репарации, процессирующих F-, DHU- и U-зонды, был выше в раковых линиях по сравнению с нормальными клетками почки человека НКС8.

Полученные результаты могут стать основой для создания статистической библиотеки данных об относительной активности ферментов репарации ДНК в индивидуальных линиях раковых клеток, а также клеток опухолевых тканей человека. В перспективе такая молекулярная характеристика клеток может помочь выявить механизмы, лежащие в основе онкогенеза и развития опухолевых заболеваний, а также проводить коррекцию методов терапии с целью повышения ее эффективности.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта ПФНИ ГАН (AAAA-A17-117020210022-4). Часть работы, включающая апробацию ДНК-субстратов типа I и II на монофункциональных ДНК-гликозилазах MBD4 и TDG, поддержана грантом РФФИ (16-14-10038). Часть работы, включающая дизайн ДНК-зондов и определение активности ферментов репарации в линиях клеток, поддержана грантом РФФИ (18-14-00135). Работа также частично поддержана Ligue National Contre le Cancer «Equipe Labellisee», Electricité de France #RB 2017 (M.S.) и French National Research Agency #ANR-18-CE44-0008, и Fondation ARC #PJA-20181208015 (A.A.I.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых в качестве объектов были использованы люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wallace, S. S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 1-14, doi: 10.1016/s0891-5849(02)00827-4.
- Boiteux, S., and Guillet, M. (2004) Abasic sites in DNA, repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair*, **3**, 1-12, doi: 10.1016/j.dnarep.2003.10.002.
- Van Loon, B., Markkanen, E., and Hubscher, U. (2010) Oxygen as a friend and enemy. How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine, *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 604-616, doi: 10.1016/j.dnarep.2010.03.004.
- Kuznetsova, A. A., Knorre, D. G., and Fedorova, O. S. (2009) Oxidation of DNA and its components with reactive oxygen species, *Russ. Chem. Rev.*, **78**, 659-678, doi: 10.1070/Rc2009v078n07abeh004038.
- Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W., and Swenberg, J. A. (1998) Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions, *Cancer Res.*, **58**, 222-225.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A., and Shaw, B. R. (1990) A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination, determination of rate constants and the activation energy, *Biochemistry (Moscow)*, **29**, 2532-2537.
- Burcham, P. C. (1999) Internal hazards, baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism, *Mutat. Res.*, **443**, 11-36.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M. S. (2004) Oxidative DNA damage and disease, induction, repair and significance, *Mutat. Res.*, **567**, 1-61.
- Leandro, G. S., Sykora, P., and Bohr, V. A. (2015) The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases, *Mutat. Res.*, **776**, 31-39, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.12.011.
- Coppede, F., and Migliore, L. (2015) DNA damage in neurodegenerative diseases, *Mutat. Res.*, **776**, 84-97, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.11.010.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 193-204, doi: 10.1038/nrc2342.
- Dietlein, F., Thelen, L., and Reinhardt, H. C. (2014) Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches, *Trends Genet.*, **30**, 326-339, doi: 10.1016/j.tig.2014.06.003.
- Trushina, E., and McMurray, C. T. (2007) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases, *Neuroscience*, **145**, 1233-1248, doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.056.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage, mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, **17**, 1195-1214.
- Gros, L., Saparbaev, M. K., and Laval, J. (2002) Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage, *Oncogene*, **21**, 8905-8925.
- Zharkov, D. O. (2008) Base excision DNA repair, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1544-1565, doi: 10.1007/s00018-008-7543-2.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13300-13305.
- Parsons, J. L., and Elder, R. H. (2003) DNA N-glycosylase deficient mice, a tale of redundancy, *Mutat. Res.*, **531**, 165-175.
- Nilsen, H., Rosewell, I., Robins, P., Skjelbred, C. F., Andersen, S., Slupphaug, G., Daly, G., Krokan, H. E., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2000) Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication, *Mol. Cell*, **5**, 1059-1065.
- Fung, H., and Demple, B. (2005) A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells, *Mol. Cell*, **17**, 463-470, doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.029.
- Xanthoudakis, S., Smeyne, R. J., Wallace, J. D., and Curran, T. (1996) The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8919-8923, doi: 10.1073/Pnas.93.17.8919.
- Unnikrishnan, A., Raffoul, J. J., Patel, H. V., Prychitko, T. M., Anyangwe, N., Meira, L. B., Friedberg, E. C., Cabelof, D. C., and Heydari, A. R. (2009) Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1488-1499, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.021.
- Gines, G., Saint-Pierre, C., and Gasparutto, D. (2014) On-bead fluorescent DNA nanoprobes to analyze base excision repair activities, *Anal. Chim. Acta*, **812**, 168-175, doi: 10.1016/j.aca.2013.12.038.
- Chaim, I. A., Nagel, Z. D., Jordan, J. J., Mazzucato, P., Ngo, L. P., and Samson, L. D. (2017) *In vivo* measurements of interindividual differences in DNA glycosylases and APE1 activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 10379-10388, doi: 10.1073/pnas.1712032114.
- Maksimenko, A., Ishchenko, A. A., Sanz, G., Laval, J., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2004) A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 240-246, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.179.
- Lebedeva, N. A., Anarbaev, R. O., Kupryushkin, M. S., Rechkunova, N. I., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., and Lavrik, O. I. (2015) Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/aprimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, *Bioconjug. Chem.*, **26**, 2046-2053, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00451.
- Thomson, G. J., Hamilton, N. S., Hopkins, G. V., Waddell, I. D., Watson, A. J., and Ogilvie, D. J. (2013) A fluorescence-based assay for the apurinic/aprimidinic-site cleavage activity of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, *Anal. Biochem.*, **440**, 1-5, doi: 10.1016/j.ab.2013.05.003.
- Li, J., Svilar, D., McClellan, S., Kim, J.-H., Ahn, E.-Y. E., Vens, C., Wilson, D. M., and Sobol, R. W. (2018) DNA repair molecular beacon assay, a platform for real-time functional analysis of cellular DNA repair capacity, *Oncotarget*, **9**, 31719-31743, doi: 10.18632/oncotarget.25859.
- Wilson, D. L., and Kool, E. T. (2018) Fluorescent probes of DNA repair, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1721-1733, doi: 10.1021/acscmbio.7b00919.
- Hu J., Liu, M.-H., Li, Y., Tang, B., and Zhang, C.-Y. (2018) Simultaneous sensitive detection of multiple DNA glycosylases from lung cancer cells at the single-molecule level, *Chem. Sci.*, **9**, 712-720, doi: 10.1039/c7sc04296e.
- Svilar, D., Vens, C., and Sobol, R. W. (2012) Quantitative, real-time analysis of base excision repair activity in cell lysates utilizing lesion-specific molecular beacons, *J. Vis. Exp.*, **66**, 4168, doi: 10.3791/4168.
- Healing, E., Charlier, C. F., Meira, L. B., and Elliott, R. M. (2019) A panel of colorimetric assays to measure enzymatic activity in the base excision DNA repair pathway, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 61, doi: 10.1093/nar/gkz171.
- Zhang, Y., Li, C., Tang, B., and Zhang, C. (2017) Homogeneously sensitive detection of multiple dna glycosylases with intrinsically fluorescent nucleotides, *Anal. Chem.*, **89**, 7684-7692, doi: 10.1021/acs.analchem.7b01655.
- Liu, G., He, W., and Liu, C. (2019) Sensitive detection of uracil-DNA glycosylase (UDG) activity based on terminal deoxynucleotidyl transferase-assisted formation of fluorescent copper nanoclusters (CuNCs), *Talanta*, **195**, 320-326, doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.083.

35. Du, Y.-C., Jiang, H.-X., Huo, Y.-F., Han, G.-M., and Kong, D.-M. (2016) Optimization of strand displacement amplification-sensitized G-quadruplex DNAzyme-based sensing system and its application in activity detection of uracil-DNA glycosylase, *Biosens. Bioelectron.*, **77**, 971-977, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.080.
36. Zhang, L., Zhao, J., Jiang, J., and Yu, R. (2012) A target-activated autocatalytic DNAzyme amplification strategy for the assay of base excision repair enzyme activity, *Chem. Commun.*, **48**, 8820-8822, doi: 10.1039/c2cc34531e.
37. Wang, L., Ren, M., Zhang, Q., Tang, B., and Zhang, C. (2017) Excision repair-initiated enzyme-assisted bicyclic cascade signal amplification for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase, *Anal. Chem.*, **89**, 4488-4494, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04673.
38. Kladova, O. A., Bazlekova-Karaban, M., Baconnais, S., Piétrement, O., Ishchenko, A. A., Matkarimov, B. T., Iakovlev, D. A., Vasenko, A., Fedorova, O. S., Le Cam, E., Tudek, B., Kuznetsov, N. A., and Saparbaev, M. (2018) The role of the N-terminal domain of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation, *DNA Repair (Amst.)*, **64**, 10-25, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.02.001.
39. Kuznetsova, A. A., Kuznetsov, N. A., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., and Fedorova, O. S. (2014) Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3042-3051, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.016.
40. Waters, T. R., Gallinari, P., Jiricny, J., and Swann, P. F. (1999) Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1, *J. Biol. Chem.*, **274**, 67-74.
41. Xia, L., Zheng, L., Lee, H. W., Bates, S. E., Federico, L., Shen, B., and O'Connor, T. R. (2005) Human 3-methyladenine-DNA glycosylase, effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease, *J. Mol. Biol.*, **346**, 1259-1274, doi: 10.1016/j.jmb.2005.01.014.
42. Esadze, A., Rodriguez, G., Cravens, S. L., and Stivers, J. T. (2017) AP-endonuclease 1 accelerates turnover of human 8-oxoguanine DNA glycosylase by preventing retrograde binding to the abasic-site product, *Biochemistry (Moscow)*, **56**, 1974-1986, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00017.
43. Baldwin, M. R., and O'Brien, P. J. (2009) Human AP endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase, *Biochemistry*, **48**, 6022-6033, doi: 10.1021/bi900517y.
44. Miroshnikova, A. D., Kuznetsova, A. A., Vorobjev, Y. N., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2016) Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, *Mol. Biosyst.*, **12**, 1527-1539, doi: 10.1039/c6mb00128a.
45. Kuznetsov, N. A., Koval, V. V., and Fedorova, O. S. (2011) Mechanism of recognition and repair of damaged DNA by human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 118-130, doi: 10.1134/S0006297911010123.
46. Kladova, O. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Mutational and kinetic analysis of lesion recognition by *Escherichia coli* endonuclease VIII, *Genes*, **8**, 1-13, doi: 10.3390/genes8050140.
47. Kuznetsova, A. A., Iakovlev, D. A., Misovets, I. V., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2017) Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Mol. Biosyst.*, **13**, 2638-2649, doi: 10.1039/c7mb00457e.
48. Yakovlev, D. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Search for modified DNA sites with the human methyl-CpG-binding enzyme MBD4, *Acta Naturae*, **9**, 88-98.

MEASURING THE ACTIVITY OF BASE EXCISION REPAIR ENZYMES IN CELLULAR EXTRACTS USING FLUORESCENT DNA PROBES*

O. A. Kladova¹, D. A. Iakovlev¹, R. Groisman^{2,3}, A. A. Ishchenko^{2,3},
M. K. Saparbaev^{2,3}, O. S. Fedorova^{1,4**}, and N. A. Kuznetsov^{1,4**}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, 630090 Novosibirsk, Russia;
E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

² Groupe "Réparation de l'AND", Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer,
CNRS UMR 8200, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

³ Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

⁴ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Received January 21, 2020

Revised February 13, 2020

Accepted February 17, 2020

DNA glycosylases remove modified, damaged, or mismatched bases from DNA by hydrolyzing the N-glycosidic bonds and generating an apurinic/apyrimidinic site (AP-site) in DNA. In most cases, the incision reaction of the AP-site is catalyzed by special enzymes called AP-endonucleases. The decrease in the functional activity of individual BER enzymes has been associated with an increased risk of cardiovascular, neurodegenerative, and oncological diseases. Here, we report the fluorescence-based assay for measuring the activity of key human DNA glycosylases and AP endonuclease. The efficacy of fluorescent DNA probes was tested by means of purified enzymes. Promising constructs were chosen to determine the activity of enzymes in the extracts of cell lines A549, MCF7, HeLa, WT-7, HEK293T, and HKC8. It was shown that the level of activity of repair enzymes was higher in cancer cell lines compared to a normal human kidney cell line.

Keywords: enzymatic activity, fluorescence, DNA probe, DNA glycosylase, AP endonuclease

УДК 577.114.4, 577.151.45, 544.165

АНАЛИЗ ТРАЕКТОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ГЛИКОЗИЛФЕРМЕНТА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ*

© 2020 Е.М. Кирилин^{1**}, В.К. Швядас^{1,2**}

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

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

Поступила в редакцию 03.02.2020

После доработки 02.03.2020

Принята к публикации 02.03.2020

Комплексное использование методов классической молекулярной динамики, симуляции титрования ионизируемых остатков, метадинамики, а также комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики позволило выявить альтернативный путь образования промежуточного гликозилфермента в механизме действия нейраминидазы вируса гриппа А H5N1. Ключевую роль в механизме обеспечивает остаток Asp151, расположенный на подвижной петле и позволяющий реализовать каталитическую функцию фермента в широком интервале pH окружающей среды благодаря формированию сети взаимодействий с молекулами воды. Так как размножение гриппа у птиц проходит в условиях пищеварительной системы при низких значениях pH, а у человека – в дыхательных путях в условиях близких к нейтральным, существование альтернативных путей протекания реакции при разной кислотности среды может опосредовать двойной тропизм вируса и циркуляцию специфических штаммов вируса H5N1, склонных к передаче от птиц к человеку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: грипп, нейраминидаза, гликозилфермент.

DOI: 10.31857/S0320972520040090

Высокопатогенные штаммы вируса гриппа H5N1 («птичий грипп») представляют серьезную проблему не только для популяций диких и одомашненных птиц, но и способны вызывать вспышки заболевания среди людей (смертность ~60%). Несмотря на то что по данным Всемирной организации здравоохранения пик инфекции наблюдали с 1998 по 2015 гг. [1], до сих пор выясняют детали адаптации вируса к человеку [2], т.к. проявление двойного тропизма вируса (птица/человек) представляет чрезвычайно опасный путь вирусной эволюции. Заражение, как правило, происходит путем взаимодействия вируса с клеткой хозяина через гликановые рецепторы клеточной мембраны – олигосахаридные фрагменты с концевой сialовой кислотой. Фермент нейраминидаза, являясь одним из клю-

чевых инструментов в жизнедеятельности вируса, обеспечивает гидролиз сialированных гликанов для последующего высвобождения созревших новых вирионов гриппа. Совместно с другим белком – гемагглютинином, ответственным за первичное распознавание гликанов, а, соответственно, и клетки хозяина, нейраминидаза формирует базовый механизм вирулентности гриппа [3]. В зависимости от антигенных свойств различают девять типов нейраминидаз, разделенных на две группы: группа 1 содержит нейраминидазы N1, N4, N5 и N8 и группа 2 – N2, N3, N6, N7 и N9 [4]. Одной из особенностей нейраминидаз штамма H5N1, обнаруженного у людей и птиц, является их низкая активность при сильноокислых значениях pH [5], тогда как нейраминидазы остальных штаммов гриппа птиц сохраняют высокую активность в сильно-кислых средах, т.к. распространение вируса у птиц происходит в пищеварительном тракте. Большинство сезонных человеческих штаммов также малоактивны при низких значениях pH [6, 7], поскольку размножение вируса у человека адаптировано к условиям дыхательных путей,

Принятые сокращения: комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики – КМ/ММ.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimiyu>, в рубрике «Papers in Press», BM20-030, 01.04.2020.

** Адресат для корреспонденции.

где в норме поддерживается уровень pH близкий к нейтральным (pH 6,5–7,0) или слабокислым значениям (pH 5,7–6,0) [8]. Таким образом, адаптация нейраминидаз H5N1 штаммов у птиц, по всей видимости, приблизила их по своим свойствам к нейраминидазам сезонных штаммов гриппа человека, что может обуславливать высокую вероятность прямой передачи вируса от птиц к людям. Установлено, что для семейства гликозидаз GH34, к которому относится и нейраминидаза вируса гриппа, характерен каталитический гидролиз углеводов по механизму двойного замещения [9, 10]. На этапе образования промежуточного ковалентного гликозилфермента один из каталитических остатков (Tyr406, активируемый Glu277) выступает в роли нуклеофила, а второй — Asp151, в качестве донора протона для стабилизации уходящей группы. Данный механизм накладывает специфические требования к функционированию остатка Asp151 в нейтральных условиях кислотности среды. Микросреда активного центра фермента, характер окружающих остатков и изолированность от внешнего раствора может изменить кислотно-основные свойства карбоксильной группы. Подобный механизм был показан для некоторых гликозидаз, когда при связывании олигосахаридного субстрата активный центр фермента закрывается с вытеснением молекул растворителя, и остаток Asp151 в протонированной форме может непосредственно взаимодействовать с уходящей группой [11]. Однако, по данным рентгеноструктурного анализа, остаток Asp151 в нейраминидазе штамма H5N1 располагается на так называемой подвижной петле-150 (а.о. 147–152) [4] в области сайта связывания субстрата, напрямую доступен растворителю и, казалось бы, не может выполнять необходимую функциональную роль при значениях pH окружающей среды 5,7–6,5.

Каким образом обеспечивается выполнение функции остатка Asp151 в каталитическом действии нейраминидазы штамма H5N1 вируса гриппа в нейтральной среде? Как связывание олигосахаридного субстрата в активном центре фермента влияет на значение pK_a остатка Asp151? Каково конформационное состояние субстрата в активном центре, соответствующее наиболее эффективному протеканию ферментативной реакции и формированию промежуточного гликозилфермента? В настоящей работе мы попытались ответить на эти вопросы, используя комплексный подход, объединяющий возможности методов классической молекулярной динамики, метадинамики, а также комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) и симуляции титрования ионизируемых остатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение структуры субстрата. В качестве субстрата использовали трисахарид — α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -Glc-O-Me — характерный терминальный структурный фрагмент гликановых рецепторов птиц. Структура этого соединения была получена с помощью сервера Glycam Biomolecule Builder [12] при использовании силового поля Amber.

Двугранные углы гликозидных связей. Двугранные углы гликозидных связей определяли следующим образом, начиная с терминального остатка сиаловой кислоты: ϕ_1 и ψ_1 , ϕ_2 и ψ_2 . ϕ_1 и ψ_1 определяли по атомам O-C2-O3-C3 и C2-C3-O3-C2, ϕ_i и ψ_i остальных гликозидных связей были определены как O-C1-O4'-C4' и C1-O4'-C4'-C3 для 1→4 связей и O-C1-O3'-C3' и C1-O3'-C3'-C2' для 1→3 связей, апострофом обозначен невозстанавливающий конец гликозидной связи.

Молекулярная динамика. Для подготовки субстратов была использована программа leap пакета AmberTools [13]. Для фермента и фермент-субстратных комплексов была создана система, включающая растворитель TIP3P [14], с расстоянием от стенок куба до молекулы субстрата не менее 15 Å. Для создания условий, приближенных к физиологическим, в систему помещали ионы Cl^- и Na^+ (до достижения 0,1 М концентраций). Суммарный заряд системы сводили к нулю при добавлении дополнительных ионов. Для каждой системы проводили минимизацию энергии (2500 шагов), последующий нагрев до 300 К в течение 60 пс, снятие ограничений с тяжелых атомов в течение 290 пс и релаксацию в течение 5 нс в NPT ансамбле (постоянное число частиц, давление и температура) с постепенным доведением плотности до постоянного значения 1,04 г/см³. Стандартные симуляции в растворе осуществляли в пакете Amber14 при температуре 300 К, шаге интегрирования 2 фс в условиях NVT ансамбля (постоянное число частиц, температура и объем). Температуру системы регулировали с использованием термостата Ланжевена [15]. Продолжительность каждой траектории составляла 1 микросекунду, кадры динамики сохраняли каждые 10 пс.

Метод ускоренной молекулярной динамики был проведен посредством встроенных функций пакета Amber14 с использованием параметров, идентичных вышеуказанным, а также заданием специфических методов значений (EthreshD 13,42; alphaD 3,2; EthreshP —20 203,56; alphaP 602,24).

Метадинамика. Расчет метадинамики выполняли на базе пакета Amber14, модифициро-

ванном PLUMED (версия 2.5) [16]. Высота добавочных Гауссовских потенциалов была определена начальным значением 0,6 ккал/моль, ширина — 0,01 или 0,0075 для переноса протона. Новые потенциалы добавляли через каждые 100 шагов динамики при шаге интегрирования 0,25 фс. Температура симуляции составляла 300 К. Коллективные переменные с двух сторон ограничивали квадратичным потенциалом на значение координационного числа вокруг атома кислорода уходящей группы на расстоянии 7 Å. Для ускорения расчета использовали технологию из 10 параллельных вычислений, объединенных общим добавленным потенциалом метадинамики [17].

Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики. Вычисления КМ/ММ проводили на базе пакета AmberTools. Для описания квантового региона использовали метод SCC-DFTB, который хорошо себя зарекомендовал при КМ/ММ моделировании реакций, катализируемых другими ферментами семейства сиалидаз [18, 19]. В квантовый регион включали остатки Tyr406, Glu277, Arg292, Asp151, мономеры сиаловой кислоты и следующей за ней галактозы, а также 14 молекул воды в радиусе 7 Å от атома кислорода уходящей группы при образовании ковалентного гликозил-фермента.

Симуляция титрования ионизируемых остатков в явном растворителе. Метод pH-REMD, имплементированный в Amber14, использовали для расчета значений pK_a Asp151, симуляцию 12 реплик проводили в интервале pH от 2 до 7,5. Обмен репликами осуществлялся каждые 5000 шагов, попытка перепротонирования — каждые 200 шагов и релаксация — в течение 300 шагов. Значения pK_a остатка рассчитывали по адаптированному уравнению Хендерсона–Хассельбаха, учитывая рассчитанную вероятность образования депротонированной и протонированной форм остатка [20].

Методы кластеризации. Кластеризацию структуры субстрата проводили на базе значений двугранных углов между углеводными мономерами с использованием следующей модификации:

отображение фазового пространства углов u_i — в общем случае L -мерного бокса P_c :

$$P_c = \{u \in R^L; 0 \leq u_i < 2\pi\}, 1 \leq i < L,$$

посредством преобразования:

$$F_c(u) = \left(\frac{1}{\sqrt{L}} \cos u_1, \frac{1}{\sqrt{L}} \sin u_1, \dots, \frac{1}{\sqrt{L}} \cos u_L, \frac{1}{\sqrt{L}} \sin u_L \right).$$

Продуктом отображения является тор T^L — L -мерная поверхность на единичной сфере S^{2L-1} . Отображение является локальной изометрией с сохранением меры расстояний [21].

Преобразованные переменные использовали для кластеризации с помощью Байесовского непараметрического метода, имплементированного в программе dpMMlowVar [22]. Оптимизацию углового параметра для данного метода проводили в пределах $[-0,6; -0,3]$ с шагом 0,01 на основании оценочной функции силуэта. При визуализации результатов кластеризации использовали метод главных компонент для трансформированных значений углов с выделением первых трех главных компонент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет pK_a Asp151. Определение сдвига pK_a остатка Asp151 в активном центре нейраминидазы N1 при связывании субстрата проводили с использованием КМ/ММ в явном растворителе и расчетов электростатического поля Пуассона–Больцмана по дискретной модели протонирования, которая учитывает состояние ионизации исследуемого остатка в зависимости от его текущей ориентации, доступности растворителя и кислотности окружающей среды. Метод позволяет проводить ряд параллельных симуляций в широком интервале значений pH. В ходе эксперимента проводится семплирование системы, в которой предусмотрены динамические переходы между конформациями с протонированной и непротонированной формой карбоксильной группы остатка Asp151. Так как нейраминидаза функционирует в виде тетрамера, расчет pK_a аспартата проводили независимо для четырех остатков (рис. 1). Проведенные вычисления показывают, что три остатка Asp151 в свободном ферменте депротонированы при нейтральных условиях среды — значения pK_a лежат в диапазоне 4,1–4,3, в то время как один остаток (обозначенный Asp2 на рис. 1) имеет более высокое значение pK_a — 6,7. Анализ положения петли-150 в субъединице с аномально высоким (6,7) значением pK_a Asp151 показал, что при моделировании в сильнокислой среде (pH 2) в этой субъединице, в отличие от остатков Asp151 в трех других субъединицах, происходит образование не наблюдаемой в кристаллографических структурах фермента карбоксил-карбоксилатной пары между Asp151 и Glu119. Можно предположить, что в этом случае имеет место переход к денатурированному состоянию, которое нельзя отнести к каталитически активной форме.

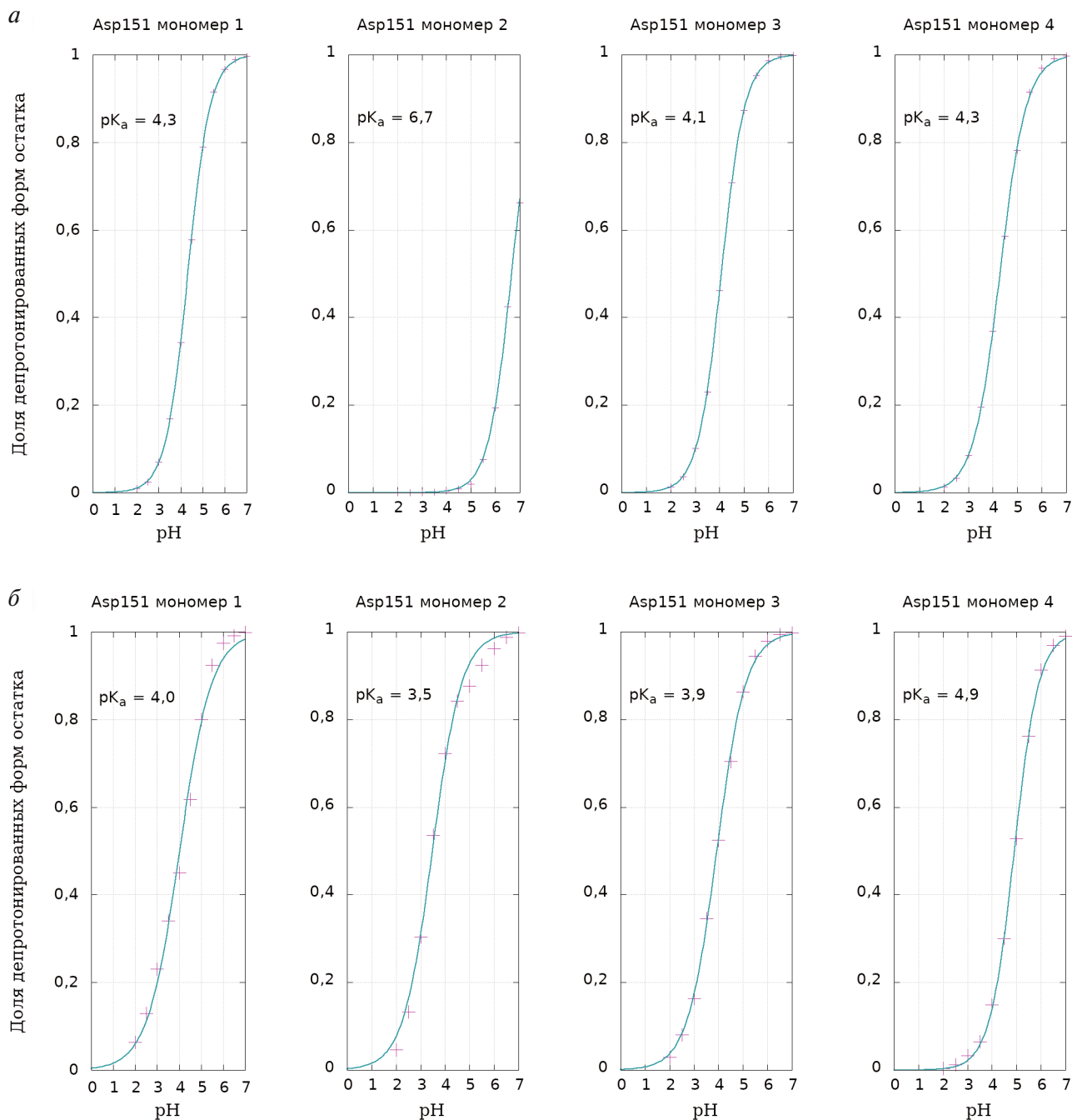


Рис. 1. Кривые титрования аминокислотных остатков Asp151 в четырех субъединицах гомотетрамера нейраминидазы вируса гриппа H5N1 с приведенными расчетными значениями pK_a (см. «Материалы и методы»): *a* — для свободной формы фермента; *б* — для комплекса фермента с олигосахаридным субстратом, связанным в активном центре. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Нейраминидазы из разных источников отличаются строением активных центров и окружением ионизируемых остатков, различия обнаружены также в динамическом поведении петли-150, содержащей Asp151 [23], что может быть причиной различного влияния связывания

субстрата на pK_a остатка в разных ферментах этого семейства. При расчетах протонирования/депротонирования аспартата в фермент-субстратном комплексе, образованном нейраминидазой N1, было обнаружено, что значение pK_a Asp151 находится в пределах 3,5–4,9. Обна-

руженный интервал значений свидетельствует о наличии различных стабилизированных структурных топологий олигосахаридного субстрата в активном центре (см. подраздел «Конформационное состояние олигосахаридного субстрата при связывании с ферментом»). Наиболее распространенной конформации субстрата соответствует значение pK_a 4,9. В то же время можно заключить, что в случае изучаемой нами нейраминидазы N1 при связывании субстрата не наблюдается столь существенного сдвига pK_a , как это было обнаружено для нейраминидазы N9 (до значений 8,0–9,0) [11]. Полученные при моделировании расчетные значения pK_a остатка аспартата в нейраминидазе N1, на первый взгляд, противоречат возможности осуществления эффективного катализа в нейтральных средах с участием этой группы для прямой передачи протона на уходящую группу субстрата. Однако подобное заключение не представляется столь категоричным, если рассмотреть другие возможные пути стабилизации уходящей группы в каталитическом механизме действия фермента. Так, при постоянном доступе молекул растворителя к карбоксильной группе остатка Asp151 возможен механизм переноса протонов Гротгуса, который уже наблюдали в ферментативных системах [24, 25]. Кроме того, депротонированная форма аспартата может стабилизировать молекулу воды в нейтральной форме или

в форме гидроксония вблизи кислорода уходящей группы и таким образом обеспечить необходимый перенос протона. Анализ функции распределения молекул воды вокруг атомов кислорода уходящей группы и карбоксильного углерода Asp151 в свободном ферменте и в фермент-субстратном комплексе (рис. 2, а, б), определенной на основе молекулярно-динамических траекторий при значениях pH 5,5; 6,0; 6,5 и 7,0, позволяет оценить возможность реализации такого механизма.

При анализе распределения расстояний от атомов кислорода карбоксильной группы до атома кислорода уходящей группы становится понятно, что молекулы воды имеют прямой доступ к разрываемой связи и могут быть не только звеном мостикового соединения между остатком Asp151 и уходящей группой, но и выступать в качестве донора протона. Включение иона гидроксония в такую цепочку передачи протона может быть обусловлено окружающими остатками фермента, а также возможностью оптимальной ориентации и стабилизации всей системы [26]. Чтобы оценить энергетические барьеры образования промежуточного гликозилфермента по альтернативному механизму, необходим конформационный анализ положений углеводного субстрата в активном центре нейраминидазы для получения стартовой структуры фермент-субстратного комплекса.

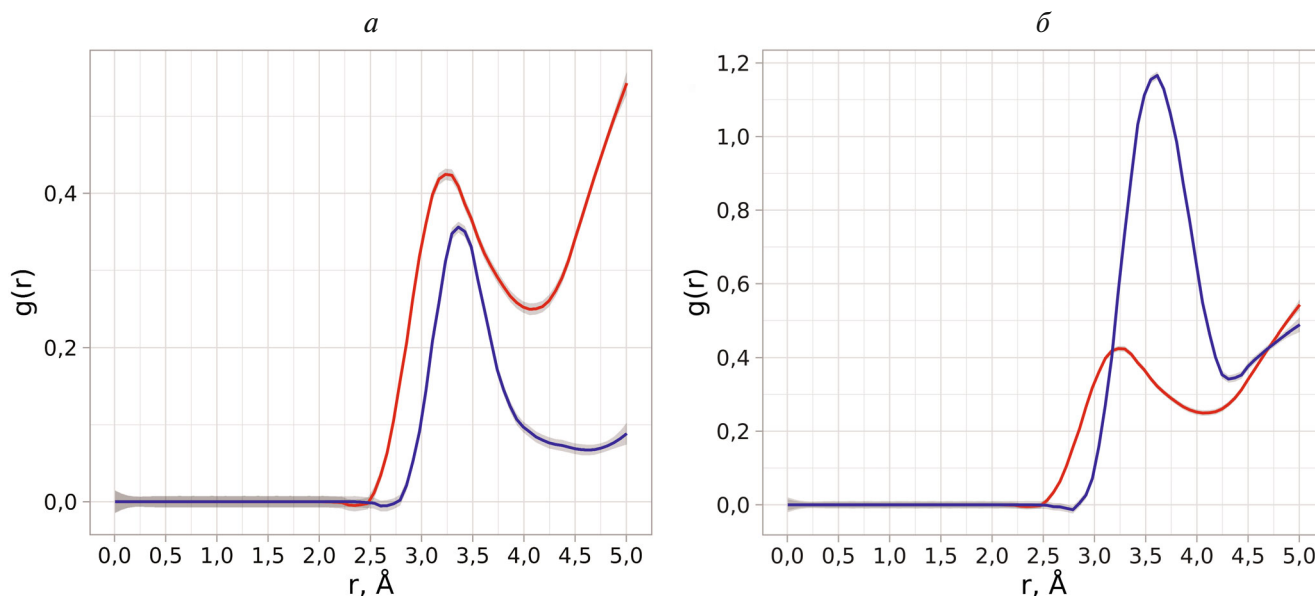


Рис. 2. а – Радиальная функция распределения молекул воды (красная линия) вокруг атома кислорода уходящей группы и функция распределения расстояний от атома кислорода уходящей группы до атомов кислорода карбоксильной группы Asp151 (синяя линия); б – радиальная функция распределения молекул воды вокруг карбоксильного углерода Asp151 в свободной (красная линия) и в связанной с олигосахаридным субстратом (синяя линия) формах фермента. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

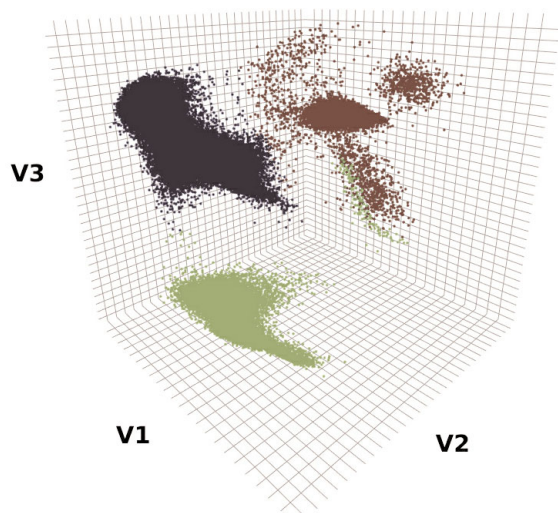


Рис. 3. Сэмплирование конформационного пространства олигосахаридного субстрата в активном центре нейраминидазы N1 с последующей кластеризацией. Для наглядности данные визуализированы относительно первых трех главных компонент при анализе восьми переменных двугранных углов, характеризующих конформацию олигосахарида; принадлежность к одному кластеру обозначена цветом.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Конформационное состояние олигосахаридного субстрата при связывании с ферментом. Конформационное пространство олигосахаридного субстрата, связанного в активном центре нейраминидазы N1, было определено при анализе траекторий молекулярной динамики, полученных в результате симуляций титрования Asp151 при различных значениях pH в интервале 5–7. Значения двугранных углов гликозидных связей в ходе симуляций были извлечены, преобразованы (как описано в экспериментальной части) и использованы для поиска кластеров стабилизированных структур — топологий (рис. 3).

Обнаруженные топологии олигосахарида, а также соответствующие характеристические значения двугранных углов приведены в таблице. Аналогичным образом проведенный поиск дополнительных структурных кластеров методом ускоренной молекулярной динамики новых топологий не выявил. Для субстрата, связанного в активном центре фермента, характерно существование трех возможных топологий (таблица). Преобладающая топология 1 характеризуется значениями двугранных углов ϕ_1 — 84,29; ψ_1 — 98,90; ϕ_2 — 95,70 и ψ_2 — 105,71. Популяции топологии 2 и 3 представлены в активном центре на 8 и 14% соответственно, при этом топология 2 ориентирована вдоль активного центра идентично топологии 1, тогда как топология 3 свиде-

тельствует о существовании альтернативной полости связывания. Следует отметить, что сходную с топологией 1 структуру трисахарида наблюдали при связывании с нейраминидазой N2 штамма H3N2 (рентгенографическая структура 4GZW [27]).

Формирование промежуточного гликозилфермента. Моделирование процесса образования гликозилфермента проводили с использованием метадинамики. Начальная структура фермент-субстратного комплекса была взята с характерными для топологии 1, преобладающей при связывании олигосахаридного субстрата в активном центре фермента (см. предыдущий раздел), двугранными углами и конформацией кольца остатка нейраминовой кислоты 5S_1 [28]. В качестве коллективных переменных, в фазовом пространстве которых происходит гидролиз субстрата и образование промежуточного продукта реакции гликозилфермента, были использованы: 1) параметр CV1, характеризующий разрыв гликозидной связи субстрата по остатку сиаловой кислоты и образование новой связи с Tyr406, а также представляющий разницу расстояний между $C1_{SIA}-O_{Tyr406}$ и $C1_{SIA}-O3_{LB}$; 2) параметр CV2, отражающий активацию нуклеофильного остатка Tyr406 переносом протона на Glu277; 3) параметр CV3, характеризующий переход протона на уходящую группу от одной из молекул воды или остатка Asp151 (рис. 4, а) и определяемый как минимальное расстояние между одним из протонов, принадлежащих молекулам воды, входящим в квантовую область (8 молекул), или протоном, принадлежащим остатку Asp151 — тем самым учитывается возможность наиболее быстрого и энергетически выгодного пути переноса протона как от молекул воды, так и от остатка Asp151.

Следует отметить, что в стартовой структуре предусматривали возможность протонирования остатка Asp151, что позволило при моделировании учитывать не только механизм передачи протона от иона гидроксония, координированного карбоксилатным анионом Asp151, но и теоретический вариант передачи протона уходя-

Характерные значения двугранных углов олигосахаридного субстрата в активном центре нейраминидазы N1

Двугранный угол	ϕ_1	ψ_1	ϕ_2	ψ_2	Соотношение
Кластер					
1	78,29	-110,90	-100,70	105,02	78%
2	74,89	-112,41	-86,49	-57,60	8%
3	-171,95	-129,39	-76,27	136,43	14%

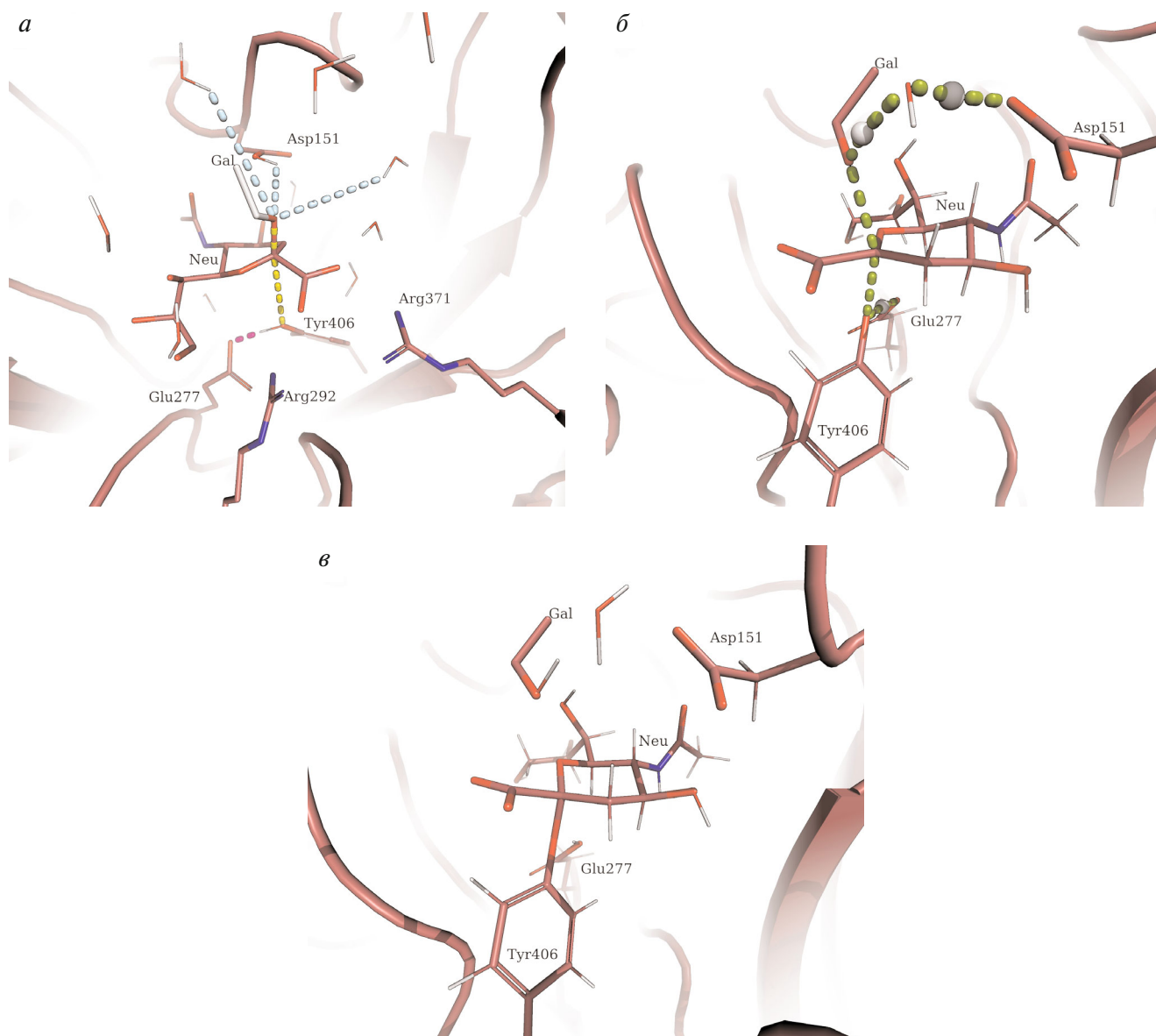


Рис. 4. Структуры основных стационарных состояний при образовании ковалентного промежуточного соединения — гликозилфермента в реакции, катализируемой нейраминидазой вируса гриппа H5N1. Gal обозначена уходящая группа, Neu — углеводный остаток сиаловой кислоты. *а* — Структура фермент-субстратного комплекса с обозначением цветным пунктиром основных составляющих коллективных переменных, включая путь переноса протона на Glu277 и активацию нуклеофильного остатка Tyr406 (розовый), для указания разрываемой и образуемой связей (желтый), и любой процесс переноса протона с окружающих молекул воды или Asp151 (голубой); *б* — структура переходного состояния системы; *в* — образование гликозилфермента.

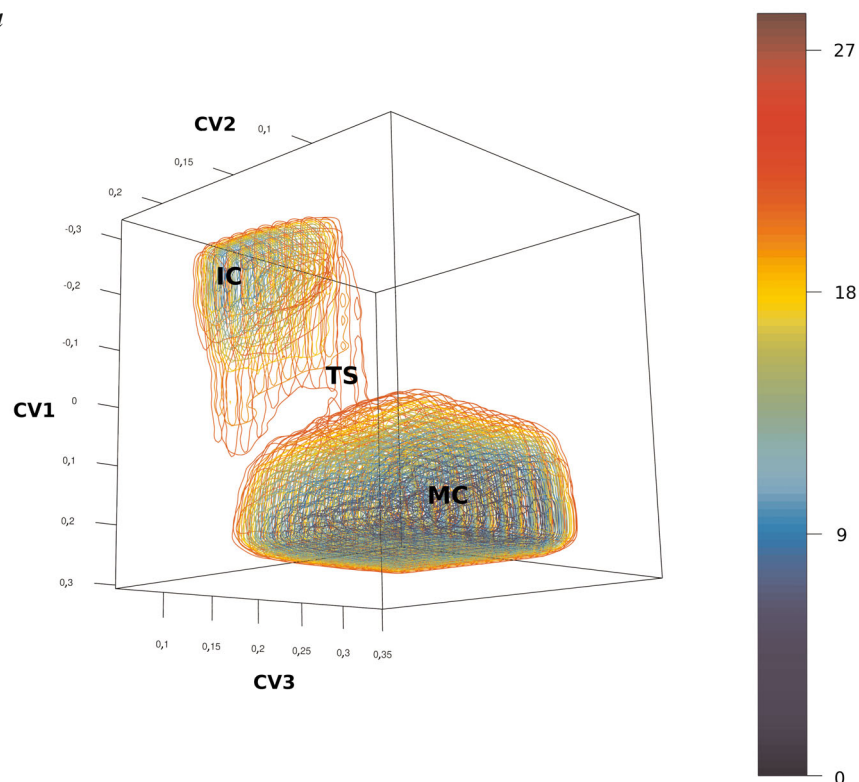
С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

щей группе напрямую. Таким образом, выбранная квантовая область представляла одинаковую стартовую точку для двух возможных путей передачи протона на уходящую группу гидролизующего субстрата.

При помощи КМ/ММ с использованием трех выбранных коллективных переменных было проведено моделирование реакции фермен-

тативного гидролиза олигосахаридного субстрата и определена энергетическая поверхность этого процесса (рис. 5). По критериям порядка связи по Полингу процесс соответствовал диссоциативному $A_N D_N$ механизму с барьером порядка 14 ккал/моль (рис. 5, *а*, *б*). Остаток сиаловой кислоты претерпевал структурное изменение от 5S_1 конформации кольца в фермент-

а



б

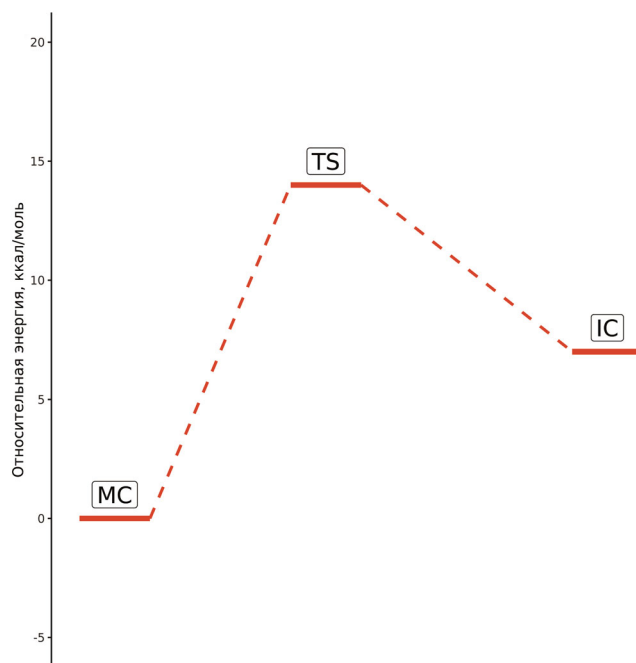


Рис. 5. а) Поверхность свободной энергии стадии образования промежуточного ковалентного соединения — гликозилфермента в реакции гидролиза олигосахаридного субстрата, катализируемого нейраминидазой вируса гриппа H5N1, построенная на основе коллективных переменных разрыва гликозидной связи субстрата по остатку сиаловой кислоты и образования новой с Tyr406 (CV1), активации нуклеофильного остатка Tyr406 (CV2) и передачи протона от одной из молекул воды или остатка Asp151 на уходящую группу субстрата (CV3). MC — комплекс фермента с субстратом, TS — переходное состояние перед образованием гликозилфермента, IC — промежуточный гликозилфермент. б) Упрощенная энергетическая диаграмма стадии образования промежуточного ковалентного соединения — гликозилфермента.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

субстратном комплексе (МС, рис. 4, а) до конформации $E_4-^3H_4$ в переходном состоянии (TS, рис. 4, б) и 1C_4 (IC, рис. 4, в) в промежуточном гликозилферменте, положение которого на энергетической диаграмме было выше исходного состояния на 7 ккал/моль (рис. 5, а, б). В ходе ферментативной реакции протон для нейтрализации уходящей группы переносился от ближайшей молекулы воды, образующей связующий мостик между гликозидной связью субстрата и остатком Asp151. Следует отметить, что остаток Asp151, как и молекула воды, может выполнять двоякую роль. Когда карбоксильная группа Asp151 протонирована, молекула воды может выступать в качестве челнока и при передаче протона на уходящую группу субстрата одновременно забирает протон от Asp151. В случае, когда карбоксильная группа Asp151 депротонирована, она может координировать ион гидроксония, который служит донором протона для уходящей группы субстрата. Вероятность реализации того или иного пути зависит от целого ряда условий: кроме кислотности среды, важное значение имеет подвижность петли-150 и особенности структурной организации активного центра в мутантных формах фермента. Участие остатка Asp151 с протонированной карбоксильной группой в каталитическом механизме, по-видимому, менее выгодно, т.к. петля-150 ограничивает движение остатка и затрудняет формирование цепи прямого переноса протона: подобные состояния не были обнаружены при независимых запусках траекторий молекулярной динамики. Тем не менее такой механизм нельзя исключить при функционировании фермента в более кислых средах. В то же время установленный нами путь передачи протона от иона гидроксония, координированного отрицательно заряженной карбоксилатной группой Asp151, может быть более универсальным и функционировать в широком интервале pH, обуславливая двойной тропизм вируса и циркуляцию специфических штаммов H5N1, способных к прямой передаче от птиц к человеку, наблюдаемой в ходе последних вспышек заболеваний 1998–2015 годов.

Каталитический механизм действия нейраминидаз различных штаммов вируса гриппа, а

также способность ферментов функционировать в различных средах, представляют не только фундаментальный, но и существенный практический интерес. Важную роль в превращении гликанов, катализируемом нейраминидазами, имеет конформационное состояние олигосахаридного субстрата, а также стадии образования и последующего гидролиза промежуточного гликозилфермента. Проведенное молекулярное моделирование механизма действия нейраминидазы N1 позволило выявить сродство активного центра фермента к определенному конформеру субстрата и установить, какие последующие конформационные изменения имеют место в ходе ферментативного превращения. Был проведен анализ возможных путей образования промежуточного гликозилфермента в реакциях под действием нейраминидазы вируса гриппа H5N1 в средах разной кислотности, что имеет непосредственное отношение к адаптации и размножению вируса в дыхательных путях человека, а также передаче штаммов вируса гриппа от птиц человеку. Понимание особенностей функционирования нейраминидаз различных штаммов вируса гриппа в различных условиях, как одного из ключевых факторов вирулентности вируса, является важным этапом как при разработке методов профилактики, так и средств борьбы с гриппом, а также другими инфекциями, отличающимися подобным механизмом.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00953).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [29].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
2. Welkers, M. R. A., Pawestri, H. A., Fonville, J. M., Sampurno, O. D., Pater, M., Holwerda, M., Han, A. X., Russell, C. A., Jeeninga, R. E., Setiawaty, V., de Jong, M. D., and Eggink, D. (2019) Genetic diversity and host adaptation of avian H5N1 influenza viruses during human infection, *Emerg. Microbes Infect.*, **8**, 262–271, doi: 10.1080/22221751.2019.1575700.
3. Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Kobasa, D., and Kawaoka, Y. (2000) Balanced hemagglutinin and neuraminidase activi-

- ties are critical for efficient replication of influenza A virus, *J. Virol.*, **74**, 6015-6020, doi: 10.1128/JVI.74.13.6015-6020.2000.
4. Russell, R. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Collins, P. J., Lin, Y. P., Blackburn, G. M., Hay, A. J., Gamblin, S. J., and Skehel, J. J. (2006) The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design, *Nature*, **443**, 45-49, doi: 10.1038/nature05114.
 5. Takahashi, T., Nidom, C. A., Quynh Le, M. T., Suzuki, T., and Kawaoka, Y. (2012) Amino acid determinants conferring stable sialidase activity at low pH for H5N1 influenza A virus neuraminidase, *FEBS Open Bio*, **2**, 261-266, doi: 10.1016/j.fob.2012.08.007.
 6. Suzuki, T., Takahashi, T., Saito, T., Guo, C.-T., Hidari, K. I.-P. J., Miyamoto, D., and Suzuki, Y. (2004) Evolutional analysis of human influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity1, *FEBS Lett.*, **557**, 228-232, doi: 10.1016/S0014-5793(03)01503-5.
 7. Takahashi, T., Kurebayashi, Y., Ikeya, K., Mizuno, T., Fukushima, K., Kawamoto, H., Kawaoka, Y., Suzuki, Y., and Suzuki, T. (2010) The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic influenza A virus enhances virus replication, *PLoS One*, **5**, doi: 10.1371/journal.pone.0015556.
 8. Fischer, H., and Widdicombe, J. H. (2006) Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium, *J. Membr. Biol.*, **211**, 139-150, doi: 10.1007/s00232-006-0861-0.
 9. Koshland, D. E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions, *Biological Reviews*, **28**, 416-436.
 10. Guce, A. I., Clark, N. E., Salgado, E. N., Ivanen, D. R., Kulminkaya, A. A., Brumer, H., and Garman, S. C. (2010) Catalytic mechanism of human α -galactosidase, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3625-3632, doi: 10.1074/jbc.M109.060145.
 11. Yu, H., and Griffiths, T. M. (2014) p K a cycling of the general acid/base in glycoside hydrolase families 33 and 34, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 5785-5792, doi: 10.1039/C4CP00351A.
 12. Woods, R. J. (2008) Biomolecule Builder, GLYCAM Web, Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia.
 13. Case, D. A., Babin, V., Berryman, J., Betz, R. M., Cai, Q., et al. (2014) Amber 14, University of California, San Francisco.
 14. Mahoney, M. W., and Jorgensen, W. L. (2000) A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions, *J. Chem. Phys.*, **112**, 8910-8922, doi: 10.1063/1.481505.
 15. Paterlini, M. G., and Ferguson, D. M. (1998) Constant temperature simulations using the Langevin equation with velocity Verlet integration, *Chem. Phys.*, **236**, 243-252, doi: 10.1016/S0301-0104(98)00214-6.
 16. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., and Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new feathers for an old bird, *Comp. Phys. Commun.*, **185**, 604-613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
 17. Raiteri, P., Laio, A., Gervasio, F. L., Micheletti, C., and Parrinello, M. (2006) Efficient reconstruction of complex free energy landscapes by multiple walkers metadynamics, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 3533-3539, doi: 10.1021/jp054359r.
 18. Pierdominici-Sottile, G., Horenstein, N. A., and Roitberg, A. E. (2011) Free energy study of the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. From the michaelis complex to the covalent intermediate, *Biochemistry*, **50**, 10150-10158, doi: 10.1021/bi2009618.
 19. Bueren-Calabuig, J. A., Pierdominici-Sottile, G., and Roitberg, A. E. (2014) Unraveling the differences of the hydrolytic activity of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and *Trypanosoma rangeli* sialidase: a quantum mechanics-molecular mechanics modeling study, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 5807-5816, doi: 10.1021/jp412294r.
 20. Harris, R. C., and Shen, J. (2019) GPU-accelerated implementation of continuous constant pH molecular dynamics in Amber: pK_a predictions with single-pH simulations, *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 4821-4832, doi: 10.1021/acs.jcim.9b00754.
 21. Costa, S. I. R., Torezzan, C., Campello, A., and Vaishampayan, V. A. (2013) *Flat tori, lattices and spherical codes*, 1-8 in 2013 Information Theory and Applications Workshop (ITA), doi: 10.1109/ITA.2013.6503002.
 22. Straub, J., Campbell, T., How, J. P., and Fisher, J. W. (2015) *Small-variance nonparametric clustering on the hypersphere*, The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 334-342.
 23. Amaro, R. E., Minh, D. D. L., Cheng, L. S., Lindstrom, W. M., Olson, A. J., Lin, J.-H., Li, W. W., and McCammon, J. A. (2007) Remarkable loop flexibility in avian influenza N1 and its implications for antiviral drug design, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7764-7765, doi: 10.1021/ja0723535.
 24. Riccardi, D., König, P., Prat-Resina, X., Yu, H., Elstner, M., Frauenheim, T., and Cui, Q. (2006) "Proton Holes" in long-range proton transfer reactions in solution and enzymes: a theoretical analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16302-16311, doi: 10.1021/ja065451j.
 25. Parke, C. L., Wojcik, E. J., Kim, S., and Worthylake, D. K. (2010) ATP Hydrolysis in Eg5 Kinesin Involves a Catalytic Two-water Mechanism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 5859-5867, doi: 10.1074/jbc.M109.071233.
 26. Mohammed, O. F., Pines, D., Dreyer, J., Pines, E., and Nibbering, E. T. (2005). Sequential proton transfer through water bridges in acid-base reactions, *Science*, **310**, 83-86.
 27. Zhu, X., McBride, R., Nycholat, C. M., Yu, W., Paulson, J. C., and Wilson, I. A. (2012) Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic acid receptors, *J. Virol.*, **86**, 13371-13383, doi: 10.1128/JVI.01426-12.
 28. Kirilin, E. M., and Švedas, V. K. (2018) Study of the conformational variety of the oligosaccharide substrates of neuraminidases from pathogens using molecular modeling, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 39-45, doi: 10.3103/S0027131418020050.
 29. Sadovnichy, V., Tikhonravov, A., Voevodin, V., and Opanasenko, V. (2017) "Lomonosov": supercomputing at Moscow State University, Contemporary High Performance Computing, doi: 10.1201/9781351104005-11.

**THE PATHWAY ANALYSIS AT THE FORMATION
OF GLYCOSYL-ENZYME INTERMEDIATE IN THE CATALYTIC
MECHANISM OF THE INFLUENZA A VIRUS NEURAMINIDASE
USING METHODS OF MOLECULAR MODELING***

E. M. Kirilin^{1} and V. K. Švedas^{1,2**}**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: kirilin@belozersky.msu.ru; vytas@belozersky.msu.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia*

Received February 3, 2020

Revised March 2, 2020

Accepted March 2, 2020

Comprehensive usage of classical molecular dynamics, constant-pH molecular dynamics simulations, metadynamics as well as combined quantum mechanical and molecular mechanical approach has revealed an alternative pathway at the formation of glycosyl-enzyme intermediate in the conversion of oligosaccharide substrates catalyzed by the H5N1 influenza neuraminidase. The Asp151 residue, located on a mobile loop, plays a key role in the mechanism of the proton transfer from the water molecule to the leaving group of the substrate during the formation of the covalent intermediate glycosyl-enzyme compound. Since the growth and replication of influenza virus in birds takes place under the conditions of the digestive system at low pH values, and in humans under conditions close to neutral, the implementation of alternative pathways for the reaction at different acidities of the medium can mediate the double tropism of the virus and the circulation of specific strains of the H5N1 virus, prone to transmission from birds to humans.

Keywords: influenza, neuraminidase, glycosyl-enzyme

УДК 578.282;57.012.7; 577.359; 616.921.5

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА H3N2 И H7N9*

© 2020 Д.Д. Подшивалов^{1**}, Е.М. Кирилин^{1,2}, С.И. Коннов¹, В.К. Швядас^{1,2**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: david.podshivalov@belozersky.msu.ru, vytyas@belozersky.msu.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.02.2020

После доработки 02.03.2020

Принята к публикации 02.03.2020

Для исследования структурной организации и динамических характеристик участка связывания ингибиторов конформационной перестройки белка разработаны компьютерные модели гемагглютининов вирусов гриппа H3N2 и H7N9. Использование метадинамики позволило составить карту свободной энергии данных участков и установить объемы их наиболее энергетически выгодных состояний. При молекулярном моделировании взаимодействия умифеновира (арбидола) с гемагглютинином показано, что для связывания лиганда необходимо увеличение объема и деформация энергетически наиболее выгодного состояния участка связывания ингибиторов конформационной перестройки. Идентифицированы аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании ингибитора и определяющие эффективность взаимодействия, а также динамическое поведение участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютининов. Выявленные свойства и особенности структурной организации участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютининов вируса гриппа необходимо учитывать при поиске новых противовирусных препаратов, способных модулировать его функциональные свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемагглютинин, вирус гриппа, молекулярная динамика, метадинамика.

DOI: 10.31857/S0320972520040107

Гемагглютинин (НА) — важнейший гликопротеин на поверхности вируса гриппа. Он играет ключевую роль в процессе заражения, так как распознает рецепторы на поверхности мембраны клетки-хозяина, при связывании претерпевает существенные структурные изменения и обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран, а также проникновение вирусных рибонуклеопротеидов в здоровую клетку [1]. Подавление процесса заражения на ранних стадиях — важная задача в борьбе с вирусом гриппа, поэтому гемагглютинин является привлекательной мишенью для поиска противовирусных препаратов. Первичной мишенью действия терапевтических средств является участок связывания олигосахаридных рецепторов, распо-

ложенный в головной области гемагглютининов, ориентированной от мембраны вируса в сторону окружающей среды, что делает его доступным для иммунной системы. Вакцины против гриппа часто направлены именно на этот участок [2]. К сожалению, его расположение приводит к тому, что этот участок приобрел крайне высокую вариабельность в результате мутаций [3–6]. В связи с этим необходим поиск противовирусных препаратов, направленных на другие, более консервативные участки связывания в структуре гемагглютининов. В последнее время особый интерес исследователей вызывает участок, расположенный в высококонсервативной стволовой области [7], вблизи пептида слияния, ответственного за структурную перестройку белка. С помощью методов рентгеноструктурного анализа показана способность данного участка связывать такие соединения, как третиичный бутилгидрохинон [7], *N*-циклогексилтаурин [8] и умифеновир [9]. Подобные соединения, связываясь на этом участке в структуре НА, по мнению авторов, способны индуцировать конфор-

Принятые сокращения: НА — гемагглютинин; CV — коллективная переменная.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-031, 01.04.2020.

** Адресат для корреспонденции.

мационные изменения прилежащих остатков, образуя сеть взаимодействий, стабилизирующих всю субъединицу НА и препятствующих структурным перестройкам белка. Найденный участок связывания ингибиторов конформационной перестройки НА может быть ранее неизвестной мишенью действия противовирусных препаратов и альтернативой для поиска новых противогриппозных средств.

Широко применяемым методом компьютерного поиска потенциальных ингибиторов белков является докинг. Для эффективного использования этого метода необходимо создать библиотеку подходящих низкомолекулярных претендентов и определить с областью их связывания. Однако в случаях, когда область связывания не является хорошо изученным участком в структуре белка, целесообразно разработать адекватную компьютерную модель молекулярной мишени, причем от качества созданной модели в значительной степени зависит успех последующего поиска новых ингибиторов. Наряду с организацией статической трехмерной структуры необходимо также исследовать динамические характеристики малоизученного участка. Как было показано на примере нейраминидазы — другого белка вируса гриппа, участки связывания лигандов могут иметь несколько возможных конформаций, их объем может также зависеть от штамма вируса [10]. Исследование динамического поведения участка связывания и поиск наиболее энергетически выгодных состояний являются ключевыми шагами молекулярного моделирования, предшествующими компьютерному поиску новых соединений. Такой подход в случае участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина является тем более актуальным, поскольку этот участок располагается в области, наиболее подверженной структурным изменениям при слиянии вируса со здоровыми клетками в организме хозяина, и при поиске комбинаторных ингибиторов необходимо учитывать эту особенность.

В данной работе для исследования структурной организации и функциональных особенностей участка связывания ингибиторов конформационной перестройки белка были созданы компьютерные модели гемагглютинаина вирусов гриппа H3N2 и H7N9. Методы молекулярного моделирования были использованы для изучения динамических характеристик участков связывания ингибиторов конформационной перестройки в гемагглютинаинах вирусов гриппа H3N2 и H7N9, выявления аминокислотных остатков, участвующих в этом процессе, и определения наиболее энергетически выгодных состо-

яний участков, а также определения влияния их динамических свойств на эффективность взаимодействия с предполагаемыми ингибиторами на примере умифеновира. Полученные знания могут быть полезны для понимания механизма действия известных препаратов или использования при поиске новых противовирусных препаратов, способных модулировать функциональные свойства гемагглютинаина вируса гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярная динамика. При исследовании участка связывания умифеновира использовали структуры гемагглютинаина H3N2 (PDB ID 5t6n) и H7N9 (PDB ID 5t6s). Для атомов белка использовали силовое поле Amber ff14SB [11]. Каждый белок был помещен в ячейку, представленную прямоугольным параллелепипедом с гранями $100 \times 100 \times 163$ Å. Минимальное расстояние между белком и границей ячейки составляло 12 Å, ограничение на радиус действия невалентных взаимодействий составляло 10 Å. Расчет дальностных электростатических взаимодействий проводили с использованием PME-алгоритма для периодических граничных условий; шаг сетки составлял 1 Å. В систему добавляли молекулы воды типа TIP3P и ионы Na^+ Cl^- в концентрации 0,1 М для создания ионной силы раствора и нейтрализации заряда. Стартовые модели оптимизировали в ходе 5000 циклов минимизации энергии. На подвижность атомов белков накладывали ограничения, после чего систему постепенно нагревали от 0 до 300 К при постоянном объеме. На следующем шаге при постоянной температуре устанавливали давление в 1 атм. Итоговый запуск молекулярной динамики НА при постоянном объеме и температуре системы проводили в программе pmemd.cuda программного пакета Amber14 [12]. Длительность полученных траекторий составляла 100 нс, из траекторий выделяли по 5000 кадров.

Метадинамика. Для того чтобы охарактеризовать энергетическое состояние участков связывания в гемагглютинаинах H3N2 и H7N9 при изменении их объема применяли метод метадинамики [13], позволяющий проводить ускоренное накопление статистики редких событий, контролируя при этом различные параметры системы с использованием т.н. коллективных переменных (CV). Ускоренное накопление статистики (или сэмплирование) происходит за счет постепенного добавления к общему потенциалу системы дополнительного набора заданных гауссовых потенциалов, зависящего от коллективных переменных. При этом коллективные

переменные могут быть выбраны в очень широком диапазоне от простых расстояний между атомами, двугранных или торсионных углов, до сложных коллективных переменных, которые могут являться, например, координационными числами между группами атомов. По результатам такого моделирования можно восстановить поверхность свободной энергии в зависимости от CV, определив, таким образом, энергетические характеристики исследуемого процесса.

При выборе коллективных переменных руководствовались тремя общепринятыми принципами: они должны определять начальное, промежуточное и конечное состояния исследуемого процесса, являться медленными для данной системы, их количество должно быть минимально возможным, так как введение любой дополнительной переменной существенно замедляет расчеты, а также усложняет анализ результатов. Для исследования участка в НА Н3Н2 в качестве CV был выбран объем участка связывания умифеновира, заданный с помощью функции CAVITY программы для моделирования метадинамики Plumed 2.4 [14]. Данная функция позволяет задавать объем, определяемый расположением в пространстве четырех атомов белка. От первого атома ко второму строится вектор $\mathbf{r}_1$. Затем из первого атома строится вектор $\mathbf{r}_2$, пер-

пендикулярный плоскости, содержащей первый, второй и третий атомы, а также вектор $\mathbf{r}_3$, ортогональный векторам $\mathbf{r}_1$ и $\mathbf{r}_2$. Первый атом и проекции четвертого атома на плоскости, образованные парами созданных векторов, определяют конечный прямоугольный параллелепипед, в котором рассчитывается значение какого-либо параметра, в данном случае количество молекул воды. В качестве опорных атомов были выбраны C α -атомы прилежащих к участку связывания аминокислотных остатков Ala304 и Leu316 цепи А, Trp92 цепи В и Lys310 С; объем прямоугольного параллелепипеда рассчитывали за вычетом объема попадающего в него фрагмента белка (рис. 1, а). По созданной CV накладывали дополнительные гауссовы потенциалы с высотой 4 кДж/моль и шириной 0,1.

В отличие от НА Н3Н2 в НА Н7Н9 различают закрытую и открытую форму исследуемого участка, поэтому для получения более полной картины изменения свободной энергии при моделировании динамического поведения участка была введена дополнительная коллективная переменная. Так как открытая и закрытая конформации определяются, главным образом, положением Arg54 цепи В, то в качестве CV была использована разница в расстояниях d1 и d2, где d1 – расстояние между атомом углерода гуани-

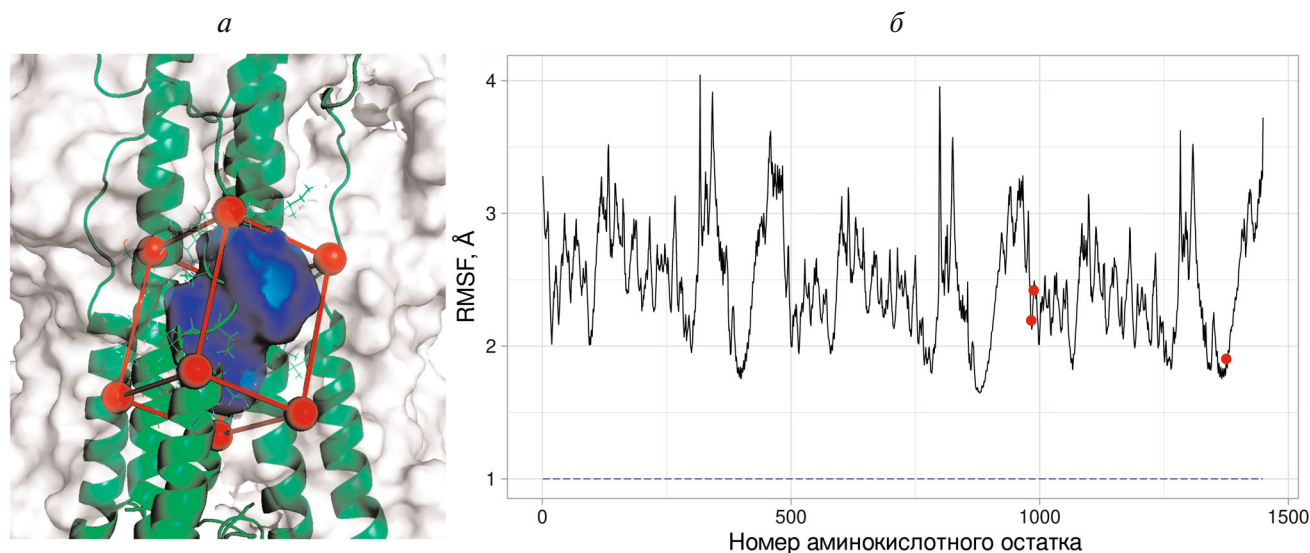


Рис. 1. а – Область связывания ингибиторов конформационной перестройки на поверхности гемагглютинаина Н3Н2, выбранная для исследования методом метадинамики: красным цветом показана внешняя граница области, зеленым цветом – элементы вторичной структуры белка, а также ряд аминокислотных остатков, синим выделена область, объем которой меняется и измеряется в ходе эксперимента; б – график RMSF для гемагглютинаина штамма Н7Н9. По форме графика можно различить три субъединицы белка. Красными точками отмечены аминокислотные остатки Glu97 цепи F, а также Asn27 и Arg32 цепи E, которые были выбраны для создания дополнительной коллективной переменной. Они обладают низким значением RMSF и расположены вблизи исследуемой области. Синей пунктирной линией показано значение RMSF (~0,96 Å) для центра масс тяжелых атомов этих остатков.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

диновой группы Arg54 и центром масс трех стабильных остатков Glu97 цепи F, а также Asn27 и Arg32 цепи E (рис. 1, б), а d2 — расстояние между атомом углерода гуанидиновой группы того же аргинина и атомом углерода карбоксильной группы остатка Glu103 цепи D. Такой выбор CV обусловлен необходимостью измерять энергию смещения остатка Arg54, не вводя при этом дополнительных искусственных ограничений на подвижность остальных остатков. Высота добавочных гауссовых потенциалов составляла 4 кДж/моль, ширина равнялась 0,1 и 0,2 для объема участка и расстояния соответственно.

Докинг. Кадры молекулярной динамики НА H3N2 были выровнены на стартовую структуру, а затем экспортированы в отдельные pdb-файлы. С помощью PMV [15, 16] были подготовлены pdbqt-файлы НА и одного из ингибиторов структурной перестройки — умифеновира. Для полученных структур был проведен докинг с помощью SMINA, использующей для докинга программу Vina [17]. SMINA запускали с параметром exhaustiveness, равным 20, а центром области для докинга была выбрана точка внутри исследуемого участка связывания лиганда. Дальнейший анализ проводили для 10 результатов докинга, характеризующих наименьшей величиной оценочной функции. Для этих структур, а также для структур, полученных методом рентгеноструктурного анализа, была составлена таблица попарных RMSD. Итоговые данные были кластеризованы методом DBSCAN [18]. Значение minPts было выбрано равным 4, значение ϵ увеличивали до тех пор, пока кристаллографическая конформация умифеновира не оказывалась в одном из формирующихся кластеров из множества выбросов. Затем проводили оценку значения *silhouette* для ϵ , начиная с найденного и заканчивая таким ϵ , при котором *silhouette* был максимальным. Визуализацию полученных кластеров методом главных компонент проводили в Rstudio с помощью функции fviz_cluster. Такую же процедуру применяли и для траекторий метадинамики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В водном растворе структура белка подвержена естественным флуктуациям, что относится и к объему участка ингибиторов конформационной перестройки НА из-за движения образующих его остатков. Мы предлагаем определить объем участка связывания как количество вмещаемых молекул воды, что позволяет его охарактеризовать, не прибегая при этом к сложным алгоритмическим процедурам, как это делается

в различных программах [19]. Такой подход представляется перспективным при моделировании конформационных состояний, а также энергетических характеристик участка с использованием дополнительных внешних воздействий, например, в метадинамике [13], так как распределение сил происходит равномерно на все молекулы воды в исследуемом объеме, а не на отдельные атомы белка, что может привести к нарушению его структуры и сэмплированию высокоэнергетических незначимых конформаций. Количество вмещаемых молекул воды в качестве коллективной переменной было выбрано для изучения участка связывания ингибиторов структурной перестройки в гемагглютинах H3N2 и H7N9. Отличительной особенностью участка структурной перестройки НА H7N9 по сравнению с НА H3N2 является показанное методами рентгеноструктурного анализа наличие открытой и закрытой форм исследуемого участка, определяемое конформацией аминокислотного остатка Arg54 цепи B [9]. Поэтому исследование структурной организации и динамического поведения участка в НА H7N9 при помощи метадинамики проводили с использованием дополнительной коллективной переменной, характеризующей положение Arg54 цепи B.

Исследование динамических свойств участка связывания ингибиторов структурной перестройки НА H3N2. Поверхность свободной энергии участка связывания ингибиторов конформационной перестройки НА H3N2 была определена при интегрировании всех добавленных к системе в ходе метадинамики гауссовых потенциалов относительно выбранной коллективной переменной количества молекул воды (рис. 2). Видно, что на графике присутствует один энергетический минимум участка связывания, который соответствует объему, вмещающему от 23 до 34 молекул воды, при этом для выхода за пределы этого интервала необходимы большие (> 4 ккал/м) затраты энергии. Важно понять, какие аминокислотные остатки формируют участок, определяют его динамическое поведение и специфические взаимодействия с ингибиторами.

Для получения этой информации из полной траектории динамики были выделены кадры, в которых объем исследуемого участка соответствовал наиболее выгодным состояниям. С помощью функционала программы VMD [20] на основе выделенных кадров была построена усредненная структура гемагглютина H3N2, соответствующая наиболее энергетически выгодному состоянию участка связывания, и по всей траектории динамики для аминокислотных остатков в радиусе 8 Å от центра участка были рас-

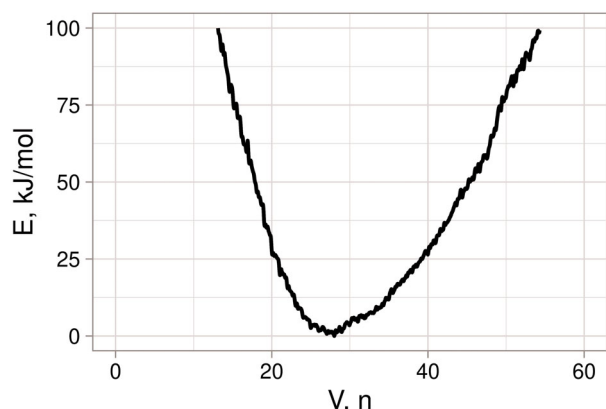


Рис. 2. Поверхность свободной энергии участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемоглобина H3N2 от объема (объем участка связывания указан в количестве вмещаемых молекул воды), определенная при моделировании с использованием метадинамики.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

считаны отклонения от усредненной структуры. Карта зависимости значений RMSD выбранных остатков от объема участка представлена на рис. 3.

Значение RMSD остатков цепи A Phe294, цепи B Lys51, Glu57, Asn95, Ala96, Leu99, Glu103, цепи C Lys27, Thr28, Ile29, Asp32, Val309, Lys310, Gln311, Leu314 и цепи D Ile89, Asp90, Leu91, Trp92, Ser93, Tyr94, Asn95, Ala96, Glu97, Leu98 оставалось малым при оптимальном объеме участка связывания (т.е. в наиболее энергетически выгодном состоянии участка положение таких остатков стабильно) и сильно возрастало за его пределы. Это говорит о том, что количество молекул воды в участке связывания зависит именно от этих остатков. Для остальных остатков этот параметр не имеет ярко выраженных минимумов в зависимости от объема, следовательно, они не влияют на количество молекул воды в участке. RMSD остатков цепи B Arg54, Asn60, Glu103 и остатка цепи C Lys310 ос-

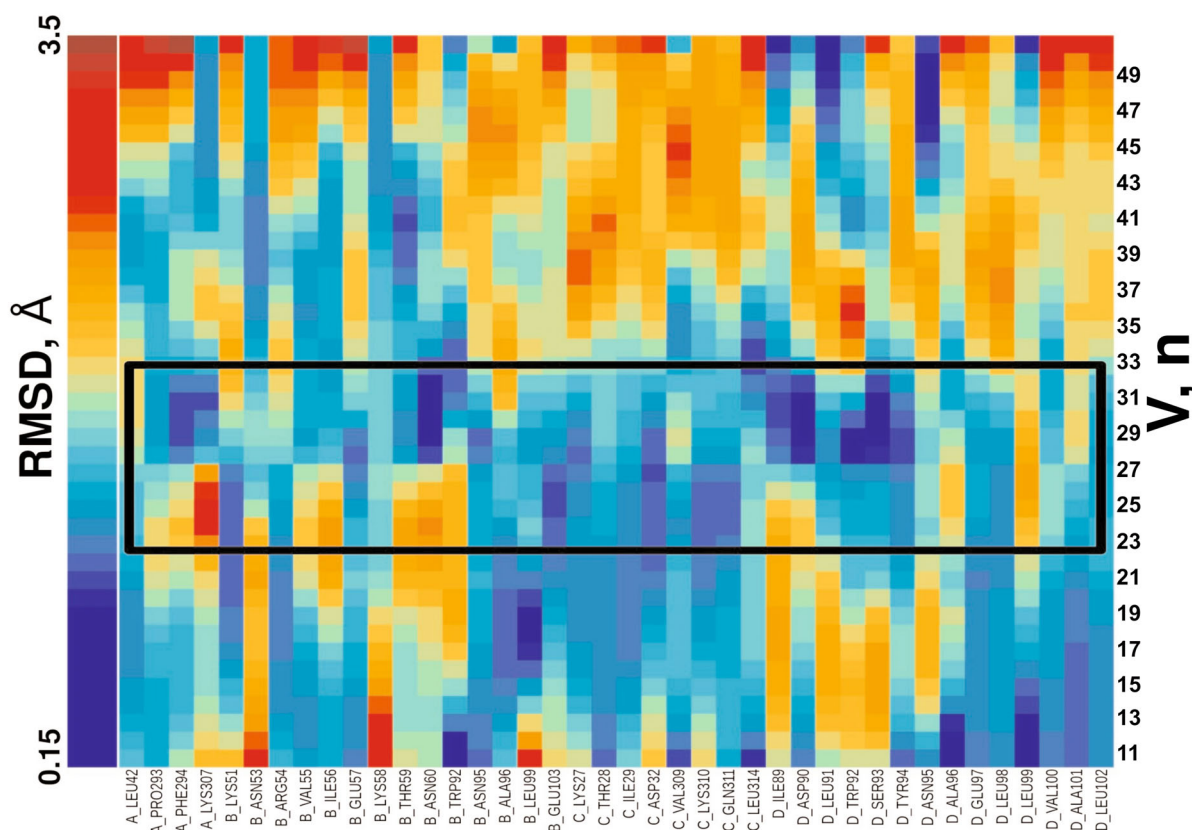


Рис. 3. Карта зависимости RMSD аминокислотных остатков, формирующих участок связывания в гемоглобине H3N2, от его объема. Черной рамкой выделена область наиболее энергетически выгодных состояний участка. Синий цвет ячейки соответствует самому низкому значению, красный — самому высокому значению RMSD аминокислотного остатка при данном состоянии участка. График позволяет определить остатки, оказывающие наиболее сильное влияние на объем участка связывания — их RMSD остается низким для наиболее энергетически выгодных состояний участка (внутри черной рамки) и растет при дестабилизации участка (увеличении или уменьшении объема за пределы оптимального), тогда как RMSD остальных аминокислотных остатков изменяется вне зависимости от объема участка.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

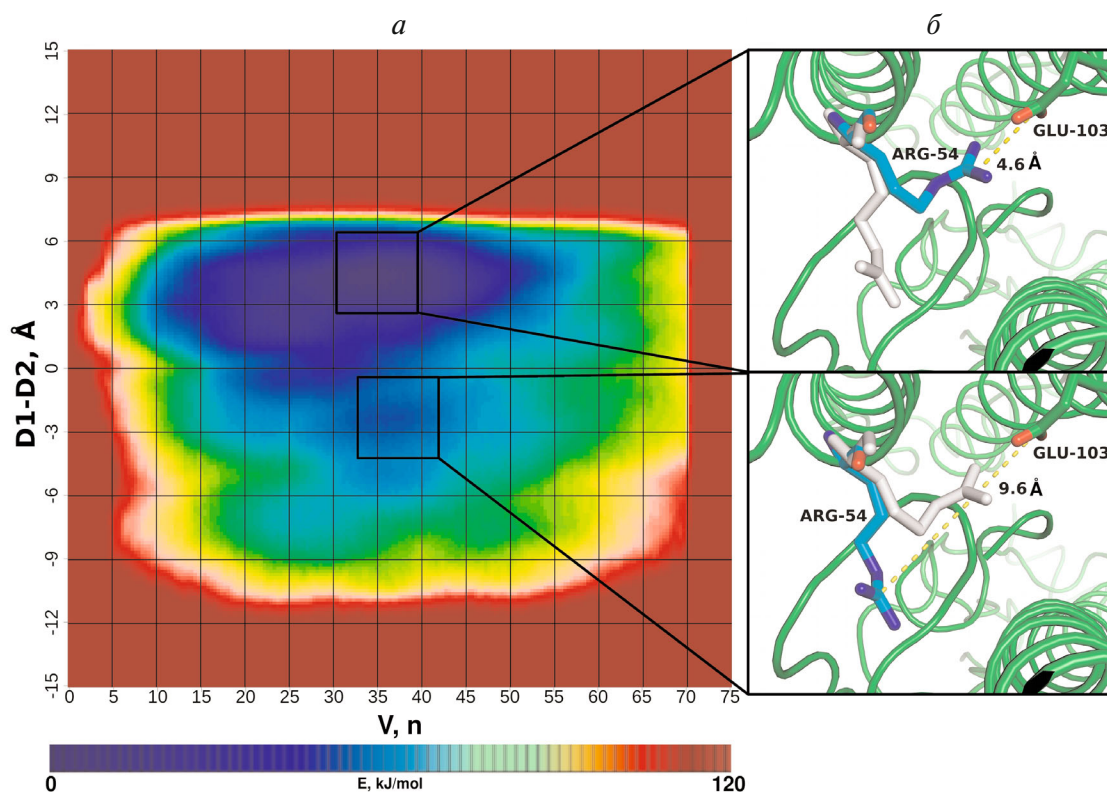


Рис. 4. Динамические характеристики участка связывания ингибиторов конформационной перестройки НА H7N9 при различных энергетических состояниях. *a* — Поверхность свободной энергии (значения представлены цветом по указанной шкале) при изменении объема участка, представленного как количество вмещаемых молекул воды. По вертикальной оси отложена разница в расстояниях $d1$ и $d2$, где $d1$ — расстояние между атомом углерода гуанидиновой группы Arg54 и центром масс трех стабильных остатков Glu97 цепи F и Asn27, Arg32 цепи E (не представлены на рисунке), а $d2$ — расстояние между атомом углерода гуанидиновой группы того же аргинина и атомом углерода карбоксильной группы остатка Glu103 цепи D (см. «Материалы и методы»); *б* — положение ключевого аминокислотного остатка Arg54 при закрытом конформационном состоянии участка (верхняя картинка) и изменение положения при переходе из закрытого состояния в открытое (нижняя картинка), зеленым цветом показаны элементы вторичной структуры НА, желтым штрихом — расстояние между атомами углерода гуанидиновой и карбоксильной групп Arg54 и Glu103.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

таются наиболее стабильными в своих положениях при флуктуациях объема участка и представляют собой особый интерес в качестве точек взаимодействия с потенциальными ингибиторами. Отдельного внимания заслуживают три остатка цепи D Ile89, Leu91 и Asn95: значение их RMSD быстро растет с увеличением объема, а затем быстро падает. Это свидетельствует о сложной зависимости объема участка связывания от конформационной подвижности и релаксационных перестроек этих остатков.

Исследование динамических свойств участка связывания ингибиторов структурной перестройки НА H7N9. Поверхность свободной энергии участка связывания ингибиторов конформационной перестройки НА H7N9 (рис. 4, *a*) была определена путем интегрирования всех добавленных к системе в ходе метадинамики гауссовых потенциалов относительно двух выбранных

коллективных переменных: 1) количества молекул воды в участке структурной перестройки и 2) положения остатка Arg54. Анализ поверхности позволяет определить различие между открытой и закрытой формами структуры участка связывания ингибиторов конформационной перестройки НА H7N9 по энергии и значению объема: оптимальному состоянию участка соответствует его закрытая конформация, которую можно характеризовать объемом 30–39 вмещаемых молекул воды, тогда как энергетически менее выгодная открытая конформация выше по энергии на 8 ккал/м и характеризуется увеличением объема участка связывания до 43 молекул воды, а также изменением положения остатка цепи В Arg54 (рис. 4, *б*).

Особенности связывания НА H3N2 и H7N9 с умифеновиром. Широкий набор конформаций белков, получаемый при использовании мета-

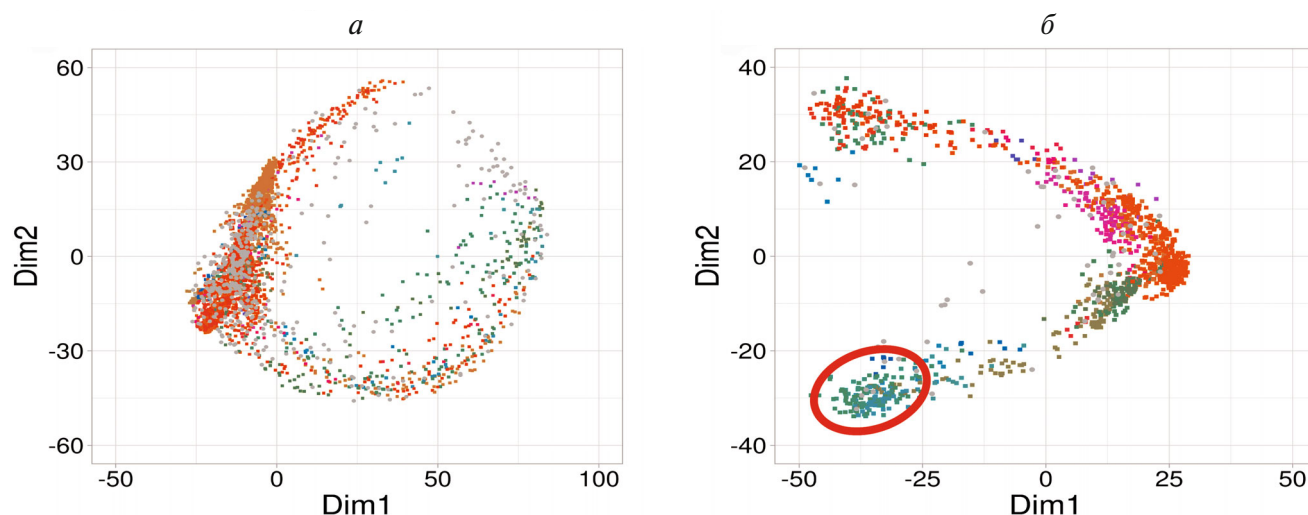


Рис. 5. Изучение расположения молекулы умифеновира на участке связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина H3N2. *а* – Кластеризация результатов докинга в структуры НА траектории классической молекулярной динамики: обособленного кластера, соответствующего кристаллографической структуре не образуется; *б* – кластеризация результатов докинга в структуры НА с расширенным состоянием участка связывания из метадинамики: красной границей показан кластер, соответствующий положению умифеновира в кристаллографической структуре. Цвет соответствует различным кластерам, Dim1 и Dim2 формируют пространство двух первых главных компонент, вычисленных для пространства конформаций и расположений умифеновира в результатах докинга. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

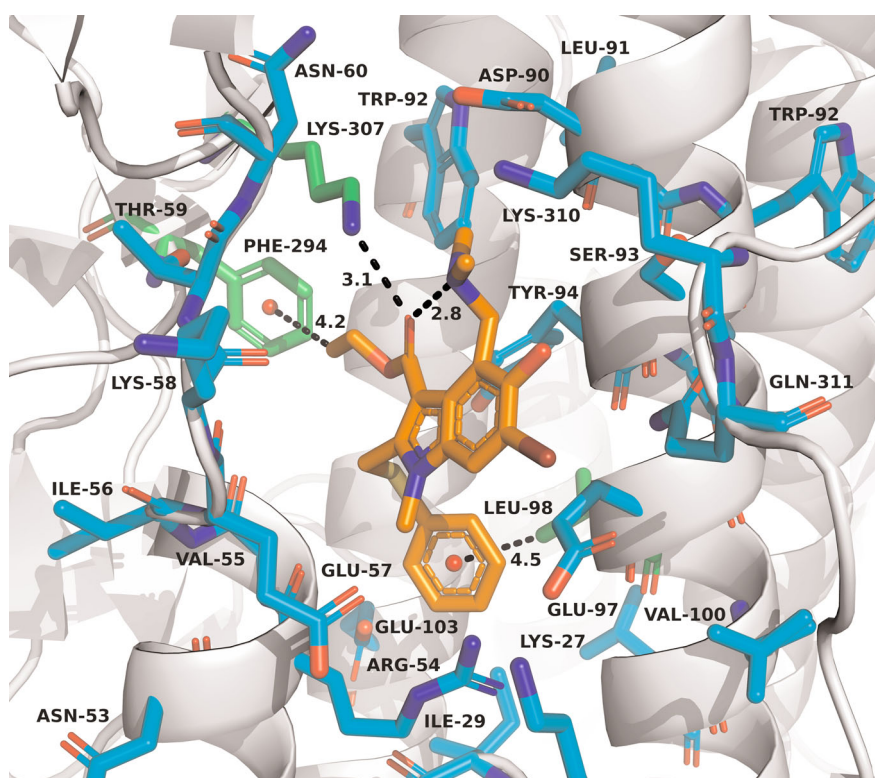


Рис. 6. Положение молекулы умифеновира в участке связывания ингибиторов структурной перестройки в НА H3N2. Оранжевыми толстыми линиями показана молекула умифеновира. Толстыми линиями показаны остатки, значения RMSD которых существенно увеличиваются с увеличением объема. Зеленым представлены остатки, отвечающие за непосредственное связывание умифеновира [9]. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

динамики, создает основу для изучения связывания ингибиторов. При оценке взаимодействий в рентгенографических структурах белок–ингибиторных комплексов, как правило, не учитывается энергетическое состояние самого участка. Характерным примером могут быть кристаллографические структуры комплексов гемагглютининов с умифеновиром. Докинг умифеновира был проведен с использованием наиболее энергетически выгодных состояний участка связывания отобранных из траекторий классической молекулярной динамики и метадинамики НА H3N2. При кластеризации результатов докинга в выбранный ансамбль конформационных состояний НА (рис. 5, а) не удалось обнаружить обособленного кластера со связанным ингибитором, положение которого соответствует кристаллографической структуре комплекса [9]. Образование комплекса было обнаружено только при кластеризации результатов докинга в структуры НА с расширенным состоянием участка связывания: обособленный кластер (значение $\epsilon = 2,6$), соответствующий результатам рентгеноструктурного анализа, представлен на рис. 5, б. Это также подтверждается тем фактом, что все аминокислотные остатки, с которыми умифеновир взаимодействует напрямую в структуре комплекса – Phe294, Lys307 цепи А и Leu98 цепи D – главным образом вовлечены в дестабилизацию наиболее выгодного энергетического состояния участка и увеличение его объема (см. рис. 3).

В НА H7N9 функционирование участка связывания ингибиторов структурной перестройки отличается от НА H3N2. В этом случае участок существует в двух конформационных состояниях – открытом и закрытом. Докинг показал, что связывание умифеновира имеет место лишь с открытым состоянием, при этом, в отличие от НА H3N2, нет необходимости в значительном увеличении объема участка. Положение ингибитора соответствует положению умифеновира в кристаллографической структуре. Особенность взаимодействия в случае НА H7N9 заключается в том, что открытое состояние участка не является наиболее энергетически выгодным и на 8 ккал/моль выше по сравнению с закрытым состоянием (рис. 6). Таким образом, и в этом

случае для связывания умифеновира необходим переход в менее энергетически выгодное состояние, связанный с перемещением остатка Arg54 и сопутствующим небольшим изменением объема участка.

Использование методов молекулярного моделирования позволило охарактеризовать наиболее энергетически выгодные состояния участков связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютининов двух штаммов вируса гриппа H3N2 и H7N9 и установить, что в обоих случаях для взаимодействия с умифеновиром необходима существенная перестройка участка связывания по сравнению со структурой свободного белка. Выявлены аминокислотные остатки, формирующие участок связывания, а также непосредственно участвующие в связывании лиганда и определяющие эффективность этих взаимодействий. В обоих случаях перестройка участка связывания белка требует затрат энергии, но протекает по разным механизмам: для НА H3N2 необходимо увеличение объема участка связывания за счет смещения целого ряда аминокислотных остатков, тогда как для НА H7N9 достаточен переход в энергетически менее выгодную открытую форму за счет перемещения остатка Arg54 цепи В. Полученные знания могут быть полезны как для понимания механизма действия известных препаратов, так и при поиске новых лидерных соединений, направленных на модуляцию функциональных свойств гемагглютининов вирусов гриппа.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 18-315-00390).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова [21].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Ann. Rev. Biochem.*, **69**, 531-569, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
2. Hensley, S. E. (2014) Challenges of selecting seasonal influenza vaccine strains for humans with diverse pre-exposure histories, *Curr. Opin. Virology*, **8**, 85-89, doi: 10.1016/j.coviro.2014.07.007.
3. Hensley, S. E., Das, S. R., Bailey, A. L., Schmidt, L. M., Hickman, H. D., Jayaraman, A., Viswanathan, K., Raman, R., Sasisekharan, R., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2009) Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift, *Science*, **326**, 734-736, doi: 10.1126/science.1178258.
4. Heider, A., Mochalova, L., Harder, T., Tuzikov, A., Bovin, N., Wolff, T., Matrosovich, M., and Schweiger, B. (2015)

- Alterations in hemagglutinin receptor-binding specificity accompany the emergence of highly pathogenic avian influenza viruses, *J. Virology*, **89**, 5395-5405, doi: 10.1128/JVI.03304-14.
5. Tharakaraman, K., Raman, R., Viswanathan, K., Stebbins, N. W., Jayaraman, A., Krishnan, A., Sasisekharan, V., and Sasisekharan, R. (2013) Structural determinants for naturally evolving H5N1 hemagglutinin to switch its receptor specificity, *Cell*, **153**, 1475-1485, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.035.
 6. Львов Д. К., Богданова В. С., Кириллов И. М., Щелканов М. Ю., Бурцева Е. И., Бовин Н. В., Федякина И. Т., Прилипов А. Г., Альховский С. В., Самохвалов Е. И., Прошина Е. С., Кириллова Е. С., Сыроешкин А. В. (2019) Эволюция пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.: динамика рецепторной специфичности первой субъединицы геммагглютинина (HA1), *Вопросы вирусологии*, **64**, 63-72, doi: 10.18821/0507-4088-2019-64-2-63-72.
 7. Russell, R. J., Kerry, P. S., Stevens, D. J., Steinhauer, D. A., Martin, S. R., Gamblin, S. J., and Skehel, J. J. (2008) Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17736-17741, doi: 10.1073/pnas.0807142105.
 8. Kadam, R. U., and Wilson, I. A. (2018) A small-molecule fragment that emulates binding of receptor and broadly neutralizing antibodies to influenza A hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 4240-4245, doi: 10.1073/pnas.1801999115.
 9. Kadam, R. U., and Wilson, I. A. (2017) Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 206-214, doi: 10.1073/pnas.1617020114.
 10. Han, N., Mu, Y., Miao, H., Yang, Y., Wu, Q., Li, J., Ding, J., Xu, B., and Huang, Z. (2016) The 340-cavity in neuraminidase provides new opportunities for influenza drug development: A molecular dynamics simulation study, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **470**, 130-136, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.007.
 11. 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, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
 12. Case, D. A., Babin, V., Berryman, J., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., Cheatham III, T. E., Darden, T. A., et al. (2014) Amber 14, University of California, San Francisco.
 13. Barducci, A., Bonomi, M., and Parrinello, M. (2011) Metadynamics, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **1**, 826-843, doi: 10.1002/wcms.31.
 14. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., and Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new feathers for an old bird, *Com. Phys. Commun.*, **185**, 604-613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
 15. Sanner, M. (1999) Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model*, **17**, 57-61.
 16. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and autoDocktools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.*, **16**, 2785-2791, doi: 10.1002/jcc.21256.
 17. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
 18. Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., and Xu, X. (1996) in *Proc. Sec. Intern. Conf. Knowl. Discov. Data Min.* AAAI Press, Portland, Oregon, pp. 226-231.
 19. Durrant, J. D., Votapka, L., Sørensen, J., and Amaro, R. E. (2014) POVME 2.0: an enhanced tool for determining pocket shape and volume characteristics, *J. Chem. Theory Comput.*, **10**, 5047-5056, doi: 10.1021/ct500381c.
 20. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph. Model.*, **14**, 33-38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
 21. Sadovnichy, V., Tikhonravov, A., Voevodin, V., and Opanasenko, V. (2013) "Lomonosov": supercomputing at Moscow State University, in *Contem. High Perform. Comp.*, Boca Raton, USA, pp. 283-307, doi: 10.1201/9781351104005-11.

STRUCTURAL ORGANIZATION AND DYNAMIC CHARACTERISTICS OF THE BINDING SITE OF CONFORMATIONAL REARRANGEMENT INHIBITORS OF HEMAGGLUTININ FROM H3N2 AND H7N9 INFLUENZA VIRUS*

D. D. Podshivalov^{1**}, E. M. Kirilin^{1,2}, S. I. Konnov¹, and V. K. Švedas^{1,2**}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia; E-mail: david.podshivalov@belozersky.msu.ru, vyta@belozersky.msu.ru

² Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received February 4, 2020

Revised March 2, 2020

Accepted March 2, 2020

Computer models of the H3N2 and H7N9 influenza virus hemagglutinin have been developed to study structural organization and dynamic characteristics of the binding site of conformational rearrangement inhibitors. The use of metadynamics made it possible to map the free energy of these binding sites and define the volume of their most energetically favorable states. At simulation of the interaction of umifenovir with hemagglutinin it was shown that ligand binding requires an increase of the volume and deformation of the energetically most favorable state of the conformational rearrangement inhibitors binding site. Amino acid residues that are directly involved in ligand binding and determine the effectiveness of the interaction, as well as the dynamic behavior of the binding site of hemagglutinin inhibitors were identified. The revealed properties and peculiarities of the structural organization of the binding site of conformational rearrangement inhibitors of influenza virus hemagglutinin should be taken into account when searching for new antiviral drugs capable to modulate its functional properties.

Keywords: hemagglutinin, influenza virus, molecular dynamics, metadynamics

УДК 576

УБАИН И МАРИНОБУФАГЕНИН: ВОЗМОЖНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НА КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИЯ И ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 Е.А. Климанова*, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко,
П.А. Абрамичева, О.Д. Лопина, С.Н. Орлов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.12.2019

После доработки 18.02.2020

Принята к публикации 18.02.2020

Продолжительные исследования, направленные на поиск эндогенных ингибиторов Na,K-АТФазы в тканях млекопитающих, привели к идентификации в биологических жидкостях убаина, маринобуфагенина (МБГ) и других кардиотонических стероидов (КТС). Известно, что продукция убаина и МБГ увеличивается при гипертонической болезни и других заболеваниях, сопровождающихся гиперволемией. Был проведен сравнительный анализ действия этих двух КТС на активность Na,K-АТФазы, измеренную по транспорту Na^+ , K^+ и Rb^+ , пролиферацию и гибель клеток почечного эпителия (HREC) и эндотелия пупочной вены человека (HUVEC), экспрессирующих $\alpha 1$ -Na,K-АТФазу. Концентрация убаина, обеспечивающая полумаксимальное ингибирование входа Rb^+ (IC_{50}) в HREC и HUVEC, составляла 0,07 мкМ. В обоих типах клеток IC_{50} для МБГ было на порядок выше, чем для убаина. Инкубация HREC и HUVEC с убаином в диапазоне концентраций 1–10 нМ в течение 30 ч приводила к росту включения [^3H]-тимидина в ДНК до 40%, при этом увеличение концентрации убаина до 0,1 мкМ полностью ингибировало синтез ДНК. МБГ в концентрации 0,1 мкМ активировал синтез ДНК на 25% в HREC, но не в HUVEC; 1 мкМ МБГ полностью подавлял синтез ДНК в HREC и на 50% – в HUVEC. В отличие от HREC, инкубация HUVEC в бессывороточной среде провоцировала апоптоз, который практически полностью подавлялся убаином и МБГ в концентрациях 0,1 и 3 мкМ соответственно. Суммируя эти данные, можно сделать два основных заключения: 1) эффекты МБГ в концентрациях, детектируемых в плазме крови (< 10 нМ), на HREC и HUVEC не опосредованы изменением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$; 2) влияние убаина в физиологическом диапазоне концентраций на эти клетки связано, скорее всего, с активацией Na,K-АТФазы, что приводит к клеточной пролиферации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убаин, маринобуфагенин, Na,K-АТФаза, соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, эпителий, эндотелий.

DOI: 10.31857/S0320972520040119

Благоприятное действие отвара из листьев наперстянки (*Digitalis purpurea* и *Digitalis lanata*) при лечении хронической сердечной недостаточности, описанное более 200 лет назад сэром William Withering [1], привело к идентификации растительных КТС, или карденолидов. К этой группе соединений относится также убаин, полученный из африканской лианы *Strophanthus gratus*, который благодаря своей гидрофильности использовали в подавляющем большинстве исследований *in vitro*. Позже из амфибий были

изолированы другие члены суперсемейства КТС, буфадииенолиды [2].

Ранние исследования показали, что добавление КТС в окружающую клетки среду ингибирует энергозависимое выведение Na^+ из клетки [3] и блокирует Na,K-АТФазу [4], фермент, обнаруженный Skou J. Chr. в 1957 г. [5]. Еще в 1953 г. Szent Gyorgyi предположил, что в организме человека и других млекопитающих существуют так называемые «эндогенные» КТС, и дал этому физиологическое обоснование [6]. В настоящее время существует большое количество данных, свидетельствующих о том, что подобные соединения присутствуют во многих тканях млекопитающих, а их содержание в плазме человека колеблется в пределах субнанолярных концентраций, достигая значения нескольких нМ при некоторых патологиях [7].

Na,K-АТФаза – это гетеродимерный белок, находящийся в плазматической мембране всех

Принятые сокращения: КТС – кардиотонические стероиды; МБГ – маринобуфагенин; Ac-DEVD-AMC – N-ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-7-амидо-4-метилкумарин; HREC – клетки почечного эпителия человека; HUVEC – клетки эндотелия пупочной вены человека; РАЕС – клетки эндотелия артерии свиньи; REC – клетки почечного эпителия.

* Адресат для корреспонденции.

клеток животных. Каталитическая α -субъединица Na,K-АТФазы (~110 кДа) в ходе каталитического цикла претерпевает конформационный переход E1–E2, обеспечивая электрогенный ($3\text{Na}^+ \text{ vs } 2\text{K}^+$) транспорт ионов против электрохимического градиента за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ. За исключением повсеместно присутствующей $\alpha 1$ -изоформы, три другие изоформы α -субъединицы экспрессируются тканеспецифичным образом и встречаются в значительных количествах в клетках нейронов и скелетных мышц ($\alpha 3$ и $\alpha 2$), кардиомиоцитах ($\alpha 2$) и семенниках ($\alpha 4$). Три изоформы β -субъединицы, кодирующей ~35 кДа белок, сильно гликозилированы. Они контролируют доставку, конформационную стабильность α -субъединицы, а также влияют на ее сродство к K_o^+ , Na_i^+ и КТС [8–10]. $\alpha 1$ -Субъединица Na,K-АТФазы является единственной изоформой, экспрессируемой в эпителиальных клетках почек (REC) [11, 12] и в клетках эндотелия [13, 14].

КТС, взаимодействуя с Na,K-АТФазой, влияют на клеточные функции, связанные с активностью фермента и поддержанием трансмембранного градиента Na^+ и K^+ , такие как электрический мембранный потенциал, клеточный объем, Na^+/H^+ и $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{Ca}^{2+}$ -обмен, симпорт Na^+ и неорганического фосфата, глюкозы, аминокислот, нуклеотидов и др. Кроме того, вне зависимости от ингибирования Na-насоса, связывание с ним КТС может активировать сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию процессов транскрипции и трансляции, клеточной адгезии, пролиферации и гибели клеток [15]. Таким образом, эти ответы клеток могут быть обусловлены как изменением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, так и/или конформационными переходами Na, K-АТФазы, опосредованными ее связыванием с КТС. Следует учитывать, что изменение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ может быть следствием не только ингибирования Na-насоса, но и его активации, которая наблюдается в области более низких концентраций КТС, чем те, что вызывают его ингибирование [15].

Известно, что различные представители семейства КТС по-разному влияют не только на разные типы клеток, они могут оказывать также различное действие на одну и ту же клетку [16, 17]. При условии, что Na,K-АТФаза является единственным рецептором КТС, это явление может быть обусловлено: 1) различным сродством разных изоформ Na,K-АТФазы к ее специфическим ингибиторам [18] и/или 2) различными конформационными переходами Na,K-АТФазы, вызванными связыванием с разными КТС [19], что приводит к инициации различных сигнальных путей.

Для установления взаимосвязи физиологических эффектов, вызываемых двумя различными КТС, с изменением внутриклеточного соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в нашем исследовании проведен сравнительный анализ действия убаина и маринобуфагенина на транспорт одновалентных катионов, пролиферацию и гибель эндотелиальных клеток (HUVEC) и клеток почечного эпителия (HREC) человека, экспрессирующих только $\alpha 1$ -Na,K-АТФазу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки почечного эпителия (HREC) и эндотелия человека (HUVEC), приобретенные у фирмы «Clonetics» (США) и у фирмы «Cell Applications» (США) соответственно, культивировали в соответствии с инструкциями производителя с использованием ростовой среды для почечного эпителия (REGM) и эндотелиальной ростовой среды (ECGM). Для HREC в качестве бессывороточной среды использовали DMEM. Все исследования проводили на клетках 4–8-го пассажей. В этом диапазоне количество пассажей клеток существенно не влияет на максимальную активность Na,K-АТФазы (данные не приведены), а также на передачу сигналов, вызванную рецептором эпидермального фактора роста [20]. Морфологию клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении в 100 раз без предварительной фиксации.

Оценка жизнеспособности клеток. Для оценки гибели клеток, обработанных КТС, анализировали степень их открепления от подложки, расщепление хроматина и активность каспазы-3. Для количественной оценки открепления клетки выращивали в 24-луночных планшетах в отсутствие или присутствии КТС. Общее содержание белка и содержание белка в клетках, прикрепленных к пластиковым подложкам, измеряли после 3-кратного промывания 2 мл среды W с помощью модифицированного метода Lowry et al. [21]. Среда W содержала 100 мМ MgCl_2 и 10 мМ буфер Hepes-Tris, pH 7,4.

Анализ расщепления хроматина проводили как описано ранее [22]. Клетки, выращенные в 24-луночных планшетах, помещали в ростовую среду, содержащую 0,2–0,5 мКи/мл ^3H -тимидина. Через 24 ч их дважды промывали 2 мл ростовой среды и инкубировали в течение 24 ч в обычных условиях. Затем клетки промывали PBS и инкубировали в 0,5 мл среды различного состава (таблица), не содержащей ^3H -тимидина, в течение следующих 18–24 ч. Для определения фрагментации хроматина планшеты пе-

Влияние бессывороточной среды, убаина и МБГ на активность каспазы-3 и расщепление хроматина в HUVEC

Условия инкубации	Активность каспазы-3, нмоль (мг белка) ⁻¹ ·ч ⁻¹	Фрагменты хроматина, %
Ростовая среда	0,8 ± 0,3	6 ± 2
Среда без сыворотки	4,5 ± 0,7	27 ± 6
Среда без сыворотки + 0,1 мкМ убаин	1,4 ± 0,3	12 ± 4
Среда без сыворотки + 3 мкМ маринобуфогенин	1,6 ± 0,5	10 ± 4
P _{1,2}	<0,01	<0,02
P _{1,3}	Н/Д	Н/Д
P _{1,4}	Н/Д	Н/Д

Примечание. Клетки инкубировали в указанных условиях в течение 24 ч. Общее содержание ДНК, меченой [³H]-тимидином, принимали за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения ± S.E., *n* = 3 (активность каспазы-3), *n* = 4 (расщепление хроматина).

переносили на лед и добавляли 1 мл ледяного буфера для лизиса (10 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, 0,5%-ный Triton X-100, pH 8,0). Через 15 мин клеточный лизат собирали, центрифугировали (16 000 g, 10 мин) и переносили для измерения радиоактивности в жидкостный сцинтиллятор (фракция F1). Оставшуюся в осадках и лунках радиоактивность экстрагировали с помощью раствора 1%-ного Ds-Na, 4 мМ ЭДТА (фракция F2). Относительное содержание фрагментов внутриклеточного хроматина определяли как процент от общего количества [³H]-меченой ДНК: $F1 / (F1 + F2) \times 100\%$. Активность каспазы-3 определяли по гидролизу флуоресцентного субстрата каспазы-3 (Ac-DEVD-AMC, *N*-ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) в присутствии и в отсутствие ее ингибитора Ac-DEVD-CHO, как описано ранее [23].

Внутриклеточное содержание Na⁺, K⁺ и Rb⁺. Активность Na,K-АТРазы оценивали по скорости КТС-чувствительного входа Rb⁺ или ⁸⁶Rb⁺, устойчивого к буметаниду (ингибитор Na,K,Cl-котранспортера) [22]. Клетки предварительно инкубировали в 0,5 мл среды REGM (HREC) или ECGM (HUVEC), содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды, содержащей 2 мКи/мл ⁸⁶Rb⁺ (HREC) или 2,5 мМ RbCl (HUVEC), 10 мкМ буметанида и КТС, и инкубировали в течение 10 мин.

Внутриклеточное содержание Na⁺ и K⁺ в HREC определяли как стационарное распределение внеклеточного и внутриклеточного ²²Na⁺ и ⁸⁶Rb⁺ [23], в HUVEC — с помощью метода пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии, как это описано в [24]. HREC предварительно инкубировали в 0,5 мл среды REGM, содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды,

содержащей 0,5 мКи/мл ⁸⁶Rb⁺ или 2 мКи/мл ²²Na⁺ и КТС, и инкубировали в течение 10 мин.

Для определения внутриклеточного содержания ионов клетки трижды промывали 1,5 мл холодного раствора 0,1 М MgCl₂, после чего лизировали их 5%-ной ТХУ. Полученные лизаты центрифугировали, в супернатанте определяли содержание ионов методами жидкостной сцинтилляции («LKB», Финляндия) и пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии («Кортек», Россия). Осадок белка растворяли в 0,1 М NaOH и определяли его концентрацию модифицированным методом Lowry et al. [21]. Содержание ионов нормировали на общее количество белка в образце.

Статистическая обработка данных. Анализ данных и их визуализацию проводили с использованием пакета ggplot2 в языке R [25]. Все значения представлены в виде среднего ± стандартная ошибка.

Материалы. Метил-[³H]-тимидин, ²²NaCl и ⁸⁶RbCl были приобретены у «PerkinElmer» (США), «ICN Biomedicals Inc.» (США) и «Amersham» (Канада) соответственно. DEVD-AMC и DEVD-CHO были получены от «BIO-MOL Research Laboratories» (США). Остальные реактивы были приобретены у фирм «Sigma-Aldrich» (США), «Gibco «Thermo Fisher Scientific» (США) и «Anachemia» (Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ионные потоки. Взаимодействие Na,K-АТРазы с КТС является относительно медленным процессом. Например, в клетках эпителия почки собаки (MDCK) насыщение участков связывания убаином в концентрации 0,13 мкМ происходит в течение 1 ч [26]. Учитывая этот

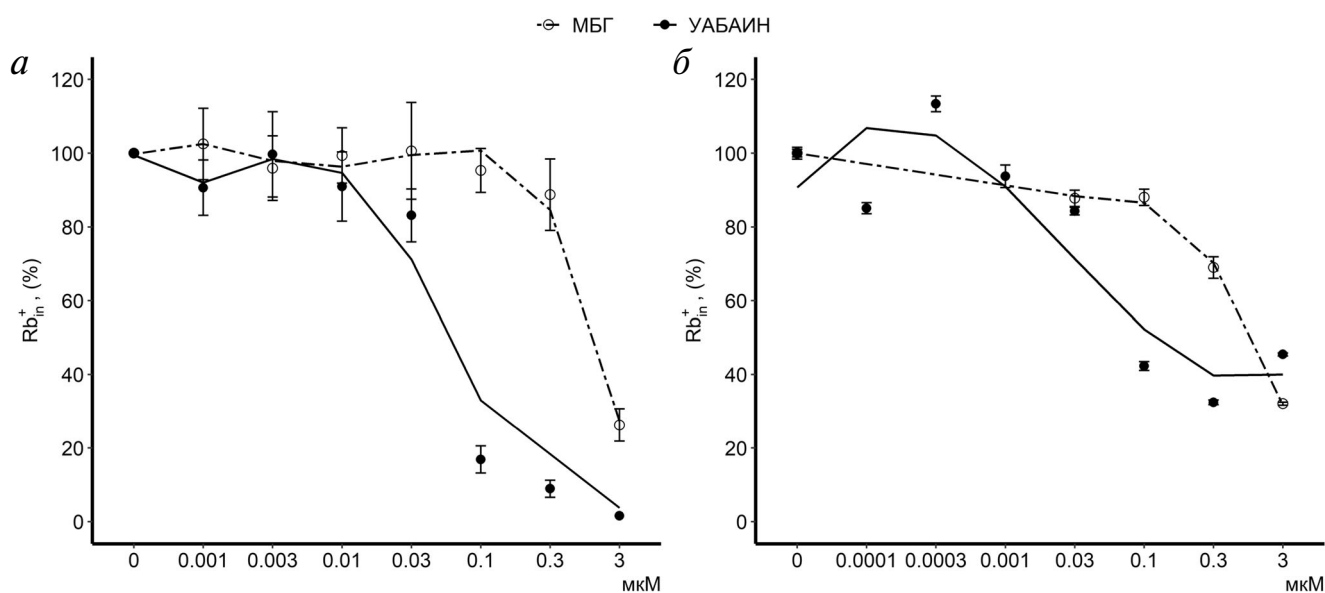


Рис. 1. Дозозависимое влияние убаина и МБГ на транспорт Rb^+ в HREC (а) и HUVEC (б). Клетки предварительно инкубировали в 0,5 мл ростовой среды, содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды, содержащей 2 мкКи/мл $^{86}Rb^+$ (HREC) или 2,5 мМ $RbCl$ (HUVEC), 10 мкМ буметанида и КТС, и инкубировали в течение 10 мин. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ S.E., $n = 3-6$

факт, клетки предварительно инкубировали с различными концентрациями убаина и МБГ в течение 3 ч, после чего добавляли к ним Rb^+ (HUVEC) или $^{86}Rb^+$ (HREC), используемый в качестве аналога K^+ для оценки активности Na, K -АТФазы в стандартных условиях. На рис. 1 показано, что в HREC и HUVEC убаин в концентрации 0,07 мкМ приводил к полумаксимальному ингибированию скорости входа Rb^+ . В обоих типах клеток МБГ обеспечивал такой же эффект в концентрациях, минимум на порядок больше ($IC_{50} \sim 2$ и 0,7 мкМ в HREC и HUVEC соответственно). Кроме того, в присутствии 0,3 нМ убаина наблюдали достоверное увеличение буметанид-чувствительного входа Rb^+ в HUVEC, что, скорее всего, связано с активацией Na, K -АТФазы. Активация Na, K -АТФазы наномолярными концентрациями убаина — явление, описанное еще в 1960-х гг. [27, 28]. Механизм этого явления обсуждается в литературе. Поскольку это явление неоднократно наблюдалось не только на клетках, но и на очищенном ферменте, предполагается, что это явление обусловлено олигомерной структурой фермента ($\alpha\beta$)₂, когда насыщение только одного центра за счет наличия кооперативных взаимодействий вызывает активацию, а последующее насыщение второго центра олигомера приводит к ингибированию активности.

Инкубация HREC в течение 3 ч в присутствии убаина и МБГ приводила к полумаксимальному ингибированию активности Na, K -АТФазы со значениями $IC_{50} \sim 0,08$ и 3 мкМ соот-

ветственно (рис. 2, а, б). Существенные различия были зафиксированы также при анализе действия этих КТС на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ в HUVEC ($IC_{50} \sim 0,3$ и 1 мкМ для убаина и МБГ соответственно) (рис. 2, в, г). Суммируя эти данные, можно заключить, что сродство Na, K -АТФазы к убаину существенно выше (минимум на порядок), чем к МБГ, в обоих типах исследуемых клеток, что согласуется с нашими данными, полученными ранее с использованием высокоочищенной $\alpha 1\beta 1$ -изоформы Na, K -АТФазы [29]. При этом значительное изменение внутриклеточного содержания Na^+ и K^+ вследствие ингибирования Na -насоса происходило при концентрациях обоих КТС, превышающих физиологический диапазон.

Синтез ДНК. Как в случае HREC, так и в случае HUVEC, 30-часовая преинкубация клеток с убаином в диапазоне концентраций от 1 до 10 нМ увеличивала включение [3H]-тимидина в ДНК до 40% (рис. 3). Это наблюдение согласуется с полученными ранее данными об увеличении синтеза ДНК и клеточной пролиферации, полученными на гладкомышечных клетках сосудов (VSMC) собаки, быка и человека [30–32], клетках гладких мышц предстательной железы человека [33], REC крысы и опоссума [12, 34] и HUVEC [35, 36]. В отличие от низких доз убаина, повышение его концентрации до 0,03 и 0,1 мкМ полностью ингибировало включение [3H]-тимидина в ДНК в HREC и HUVEC соответственно. Не было обнаружено какой-либо активации синтеза ДНК под действием

МБГ в HUVEC, тогда как в HREC наблюдали ~ 25% активацию включения метки в ДНК при концентрации этого КТС 0,1 мкМ. При повышении концентрации до 1 мкМ МБГ полностью ингибировал синтез ДНК в HREC, а в HUVEC происходило его снижение на 50% (рис. 3).

Эти результаты коррелируют с данными о том, что инкубация HUVEC в присутствии 1–3 нМ убаина, которая сопровождается уменьшением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ за счет активации Na,K-АТФазы, приводит к увеличению клеточной пролиферации. При этом сни-

жение роста клеток наблюдали при более высоких концентрациях убаина, вызывающих диссипацию трансмембранного градиента Na^+ и K^+ [37].

Действительно, максимальное увеличение синтеза ДНК в HREC было отмечено в присутствии 3 нМ убаина (рис. 3), тогда как значительное снижение входа $^{86}Rb^+$ и повышение $[Na^+]_i$ были обнаружены при его концентрациях >10 нМ (рис. 1 и 2).

Гибель клеток. Наряду со снижением синтеза ДНК существенное ингибирование включения $[^3H]$ -тимидина в ДНК в HREC и HUVEC, обра-

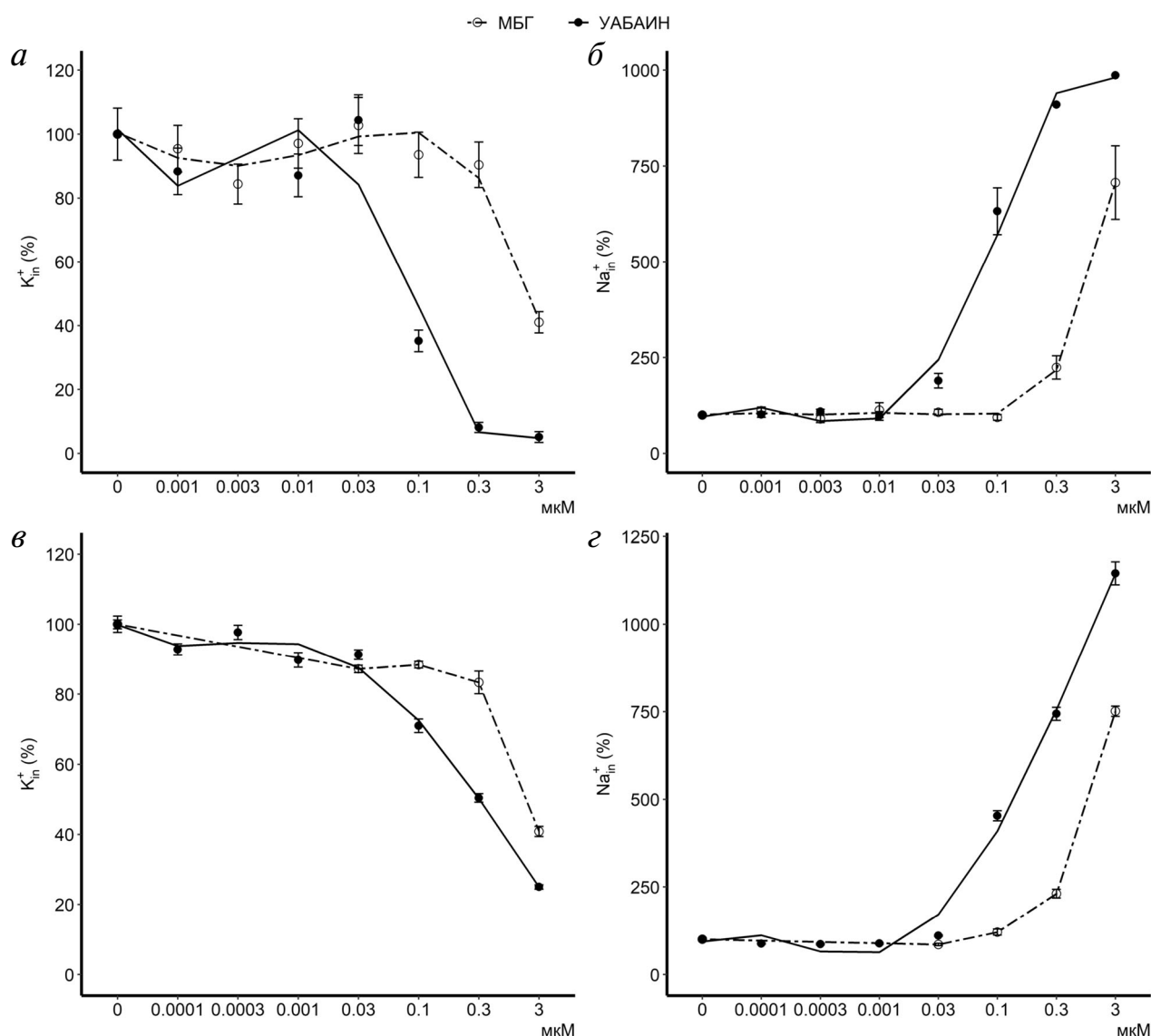


Рис. 2. Дозозависимое влияние убаина и МБГ на внутриклеточное содержание K^+ и Na^+ в HREC (а, б) и HUVEC (в, г). HREC предварительно инкубировали в 0,5 мл ростовой среды, содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды, содержащей 0,5 мКи/мл $^{86}Rb^+$ или 2 мКи/мл $^{22}Na^+$ и КТС, и инкубировали в течение 10 мин. Внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ в отсутствие КТС было принято за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ S.E., $n = 3-6$

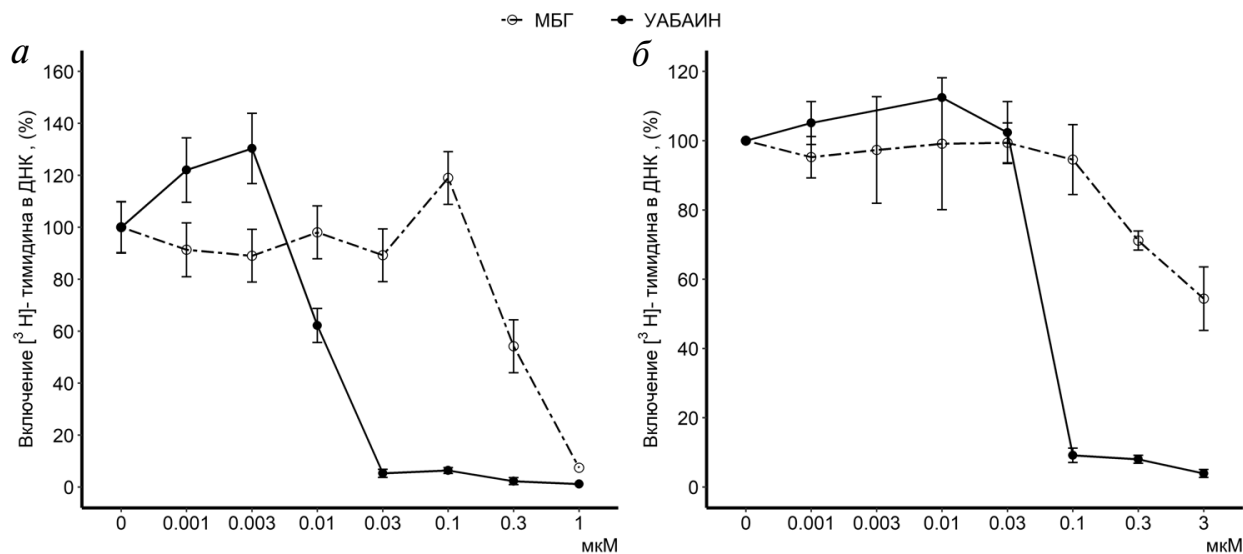


Рис. 3. Дозозависимое влияние убаина и МБГ на включение [³H]-тимидина в ДНК HREC (а) и HUVEC (б). Клетки инкубировали в течение 30 ч в 1 мл ростовой среды, содержащей различные концентрации убаина или МБГ, а затем добавляли 50 мкл той же среды, содержащей 1 мкг [³H]-тимидина, и инкубировали в течение 15 ч. Результаты представлены в виде среднего значения ± S.E., *n* = 4

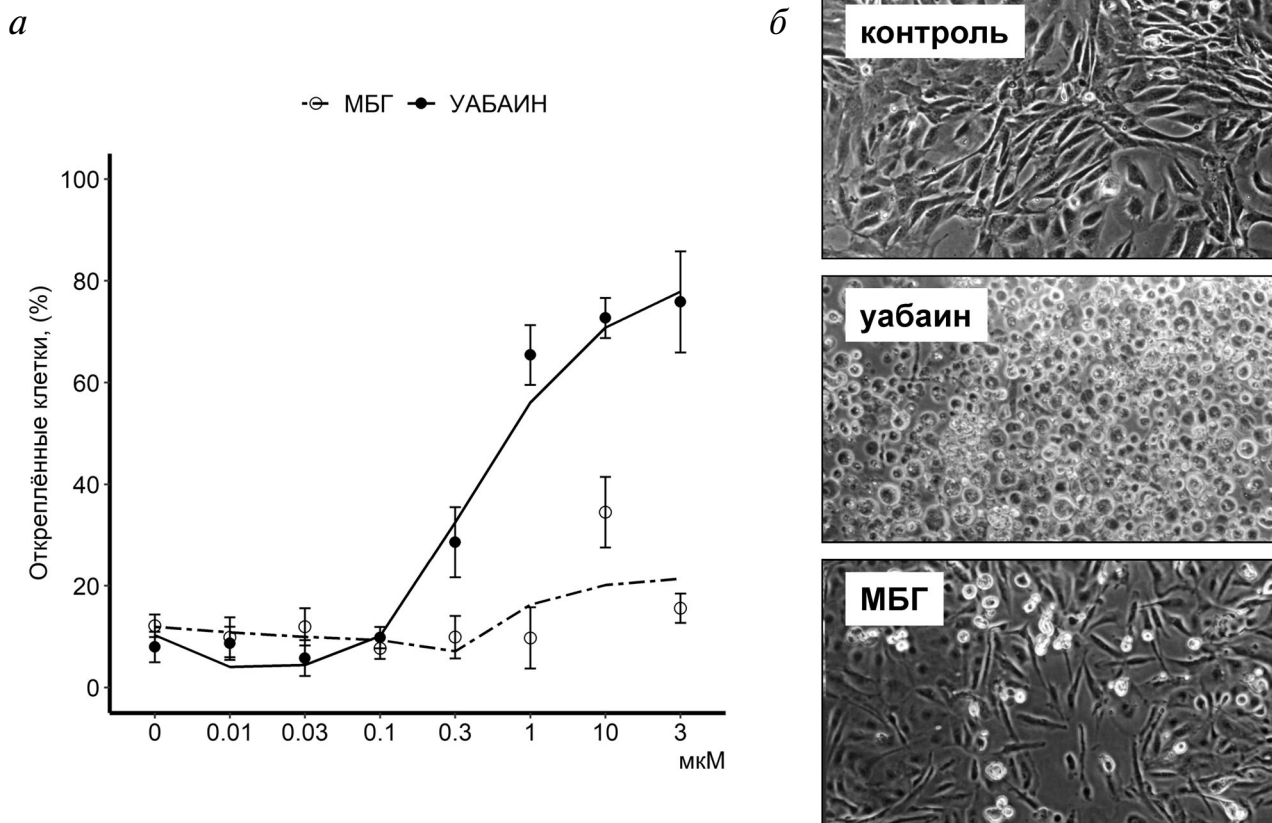


Рис. 4. Влияние убаина и МБГ на выживаемость HREC. а — Доля открепившихся клеток в зависимости от концентрации убаина и МБГ. HREC инкубировали в бессывороточной среде, содержащей различные концентрации убаина или МБГ, в течение 45 ч. Общее количество прикрепленных и открепившихся клеток было принято за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения ± S.E., *n* = 4.; б — фазово-контрастная микроскопия HREC, обработанных бессывороточной средой, содержащей 3 мкМ убаина или МБГ, в течение 45 ч (×100 увеличение)

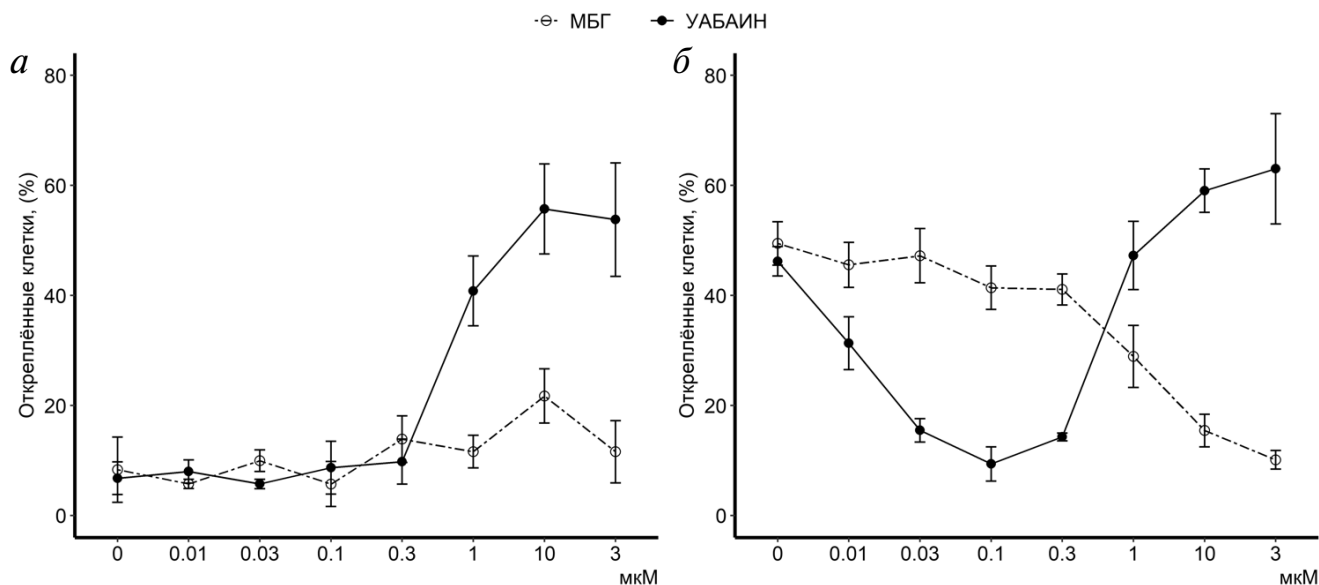


Рис. 5. Влияние убаина и МБГ на выживаемость HUVEC. Доля открепившихся HUVEC в зависимости от концентрации убаина и МБГ. Клетки инкубировали в ростовой (а) или в бессывороточной среде (б), содержащей различные концентрации убаина или МБГ, в течение 45 ч. Общее количество прикрепленных и открепившихся клеток было принято за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ S.E., $n = 4$

ботанных убаином в концентрациях $>0,03$ мкМ, может быть обусловлено снижением выживаемости клеток. Чтобы оценить это, была использована фазово-контрастная микроскопия и проанализировано прикрепление клеток к подложкам. Не было обнаружено увеличения смертности HREC по отношению к контролю при их выдерживании в течение 45 ч в бессывороточной среде с 0,1 мкМ убаина, тогда как повышение его концентрации с 0,3 до 3 мкМ приводило к отслоению и массивному увеличению количества набухших плавающих клеток (рис. 4). Этот тип гибели клеток впервые был обнаружен в обработанных убаином клетках MDCK [38] и эндотелия из аорты свиньи (РАЕС) [39] и назван онкозом [40]. В отличие от убаина 45-часовая инкубация с 3 мкМ МБГ не влияла на выживаемость HREC (рис. 4). Аналогичные результаты были получены при исследовании дозозависимого действия убаина и МБГ на открепление HUVEC, содержащихся в ростовой среде (рис. 5, а).

В отличие от REC и РАЕС [38,39] отсутствие сыворотки в среде вызывало апоптоз HUVEC, о чем свидетельствуют данные по активации каспазы-3 [41]. На рис. 5, б показано, что открепление апоптотических клеток в бессывороточной среде практически полностью устранялось под действием убаина и МБГ в концентрациях 0,1 и 3 мкМ соответственно. Антиапоптотическое действие убаина и МБГ было подтверждено фазово-контрастной микроскопией, а также

анализом расщепления хроматина и активности каспазы-3 (таблица). Увеличение концентрации убаина до 3 мкМ приводило к массовому откреплению клеток (рис. 5, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение последних трех десятилетий многие исследовательские группы сообщали, что концентрация убаина, МБГ и других КТС в плазме крови в норме изменяется от 0,1 до 1 нМ и увеличивается до 10 нМ при некоторых патологических состояниях [7]. Последние данные свидетельствуют в пользу того, что эндогенные КТС наряду с повышением $[Na^+]_i$ за счет ингибирования Na-насоса могут участвовать в патогенезе гипертонической болезни и других нарушений, вызывая также Na^+ -независимую передачу сигналов, которая приводит к тканеспецифической модуляции клеточной пролиферации и смерти [15]. Стоит отметить, что в настоящий момент существует несколько основных вопросов, связанных с функционированием Na,K-АТФазы, относительно которых отсутствует единое мнение среди различных групп исследователей. К таким вопросам относится и проблема «эндогенных КТС» [42]. Данные, полученные в нашем исследовании, привели нас к четырем выводам:

1) МБГ в физиологических концентрациях не может влиять на функцию клеток почечного

эпителия и сосудистого эндотелия человека, экспрессирующих $\alpha 1$ -Na,K-АТФазу, посредством изменения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения. Действительно, существенную модуляцию активности Na,K-АТФазы (рис. 1), изменение внутриклеточного содержания Na^+ и K^+ (рис. 2), а также влияние на пролиферацию и смерть HREC и HUVEC (рис. 3 и 5) мы наблюдали при концентрациях МБГ > 100 нМ, что как минимум в 50 раз выше его максимальной концентрации, детектированной в плазме крови [34]. Следует подчеркнуть, что наши результаты не исключают возможного влияния маринobufагенина на функции этих клеток из-за его локального накопления в ограниченных в пространстве клеточных компартментах. Дозозависимый эффект этого КТС на Na^+_i , K^+_i -опосредованные и -независимые сигналы в других типах клеток заслуживает дальнейшего изучения;

2) убаин в физиологических концентрациях влияет на пролиферацию клеток почечного эпителия, что не связано с ингибированием Na,K-АТФазы и увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. Действительно, максимальное увеличение синтеза ДНК в HREC наблюдалось в присутствии 3 нМ убаина (рис. 3), тогда как значительное снижение входа $^{86}Rb^+$ и увеличение $[Na^+]_i$ было обнаружено при концентрациях убаина, превышающих 10 нМ (рис. 1 и 2). В отличие от HREC, в HUVEC в присутствии наномолярных концентраций убаина происходило снижение входа Rb^+ (рис. 1). Для оценки относительного влияния эндогенного убаина на регуляцию Na^+_i , K^+_i -опосредованных функций клеток эндотелия также требуются дополнительные эксперименты;

3) убаин и МБГ ингибировали апоптоз HUVEC, индуцированный их инкубацией в среде без сыворотки (т. е., без ростовых факторов), в концентрациях, превышающих 10 и 1000 нМ соответственно (рис. 5). При этих концентрациях они ингибировали Na,K-АТФазу (рис. 1) и увеличивали соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$. Это наблюдение согласуется с $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -опосредованным механизмом антиапоптотического действия убаина, выявленным у VSMC крыс [22] и PAEC [39];

4) убаин при концентрациях выше 0,1 мкМ вызывал смерть HREC и HUVEC, классифицированную ранее как онкоз. Несмотря на значительное ингибирование Na,K-АТФазы и увеличение отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, 3 мкМ МБГ не оказывало цитотоксического действия на оба типа клеток (рис. 4, рис. 5). Это наблюдение согласуется с отчетливым влиянием убаина и МБГ на выживаемость клеток MDCK [43]. Механиз-

мы, лежащие в основе этого интригующего явления, остаются неизвестными.

Таким образом, активация синтеза ДНК в обоих исследуемых типах клеток наблюдалась при концентрации убаина < 10 нМ, при этом полное ингибирование синтеза ДНК происходило в присутствии 30 и 100 нМ убаина в HREC и HUVEC соответственно. Смерть клеток обоих типов наблюдалась при концентрации убаина, превышающей 0,3 мкМ. Концентрации убаина, обеспечивающие полумаксимальное ингибирование Na,K-АТФазы в HREC и HUVEC, составляли $\sim 0,08$ и 0,3 мкМ соответственно. По всей видимости, ингибирование синтеза ДНК и смерть клеток обусловлены увеличением $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения в результате ингибирования Na,K-АТФазы.

Активацию синтеза ДНК в HREC наблюдали при 0,1 мкМ МБГ, на синтез ДНК в HUVEC МБГ подобного действия не оказывал, при этом 1 мкМ этого стероида полностью подавлял синтез ДНК в HREC и на 50% — в HUVEC. Однако не была обнаружена гибель обоих типов клеток при воздействии на них МБГ. Концентрация этого КТС, при которой происходило полумаксимальное ингибирование Na,K-АТФазы в HREC и HUVEC, составляла ~ 1 мкМ.

Разницу в эффектах, обусловленных разными стероидами на один и тот же тип клеток, можно объяснить различием в сродстве этих КТС к Na,K-АТФазе [29]. Различия в эффектах одного КТС на разные типы клеток опосредованы, по всей видимости, изоферментным составом Na,K-АТФазы, присутствующей в мембранах этих клеток. Так, в HREC экспрессируется только $\alpha 1\beta 1$ -изофермент, тогда как в HUVEC присутствует также $\alpha 1\beta 3$ (собственные неопубликованные данные).

Принято считать, что Na,K-АТФаза является единственным рецептором для КТС. Однако в последнее время появились данные, свидетельствующие, что эти соединения влияют на метаболизм клетки (например, на синтез холестерина), воздействуя на синтез белков через белки-регуляторы [16, 44, 45]. Стоит отметить, что прямых доказательств того, что КТС взаимодействуют с этими регуляторными белками, локализованными внутри клетки, в цитируемых работах нет. Ранее нами было показано, что изменение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения влияет на экспрессию многих генов даже в присутствии внутри- и внеклеточных хелаторов Ca^{2+} [46], т.е. изменение метаболизма, обнаруженное в указанных выше работах, может быть обусловлено именно изменением $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения, которое авторы этих работ не контролировали. С другой стороны, мы обнаружили, что инкуба-

ция HUVEC с убаином и МБГ в концентрациях, не оказывающих влияния на $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношение, не приводит к изменению транскриптома этих клеток [47]. Таким образом, вопрос о наличии иных мишеней для КТС, помимо Na,K-АТРазы, остается открытым.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-34-00344).

Благодарности. Мы выражаем глубокую признательность профессору А.Я. Багрову (Санкт-Петербург, Россия) за любезно предоставленный маринобуфагенин.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди и животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krikler, D. M. (1985) The foxglove, "the old woman from Shropshire" and William Withering, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **5**, 3-9, doi: 10.1016/s0735-1097(85)80457-5.
- Krenn, L., and Kopp, B. (1998) Bufadienolides from animal and plant sources, *Phytochemistry*, **48**, 1-29, doi: 10.1016/s0031-9422(97)00426-3.
- Schatzmann, H. J. (1953) Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **11**, 346-354.
- Skou, J. Chr. (1960) Further investigations on a Mg^{++} Na^{+} -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 6-23, doi: 10.1016/0006-3002(60)90746-0.
- Skou, J. Chr. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394-401.
- Szent-Györgyi, A. (1953) Chemical physiology of contraction in body and heart muscle, *Science*, **119**, 803, doi: 10.1126/science.119.3101.803.
- Khalaf, F. K., Dube, P., Mohamed, A., Tian, J., Malhotra, D., Haller, S. T., and Kennedy, D. J. (2018) Cardiotonic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated by the Na^{+}/K^{+} -ATPase, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2576, doi: 10.3390/ijms19092576.
- Blanco, G., and Mercer, R. W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function, *Am. J. Physiol.*, **275**, 633-650, doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633.
- Therien, A. G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation, *Am. J. Physiol.*, **279**, 541-566, doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.C541.
- Rajasekaran, S. A., Gopal, J., Willis, D., Espineda, C., Twiss, J. L., and Rajasekaran, A. K. (2004) Na,K-ATPase β 1-subunit increases the translation efficiency of the α 1-subunit in MSV-MDCK cells, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3224-3232, doi: 10.1091/mbc.E04-03-0222.
- Herrera, V. L., Emanuel, J. R., Ruiz-Opazo, N., Levenson, R., and Nadal-Ginard, B. (1987) Three differentially expressed Na, K-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications, *J. Cell Biol.*, **105**, 1855-1865, doi: 10.1083/jcb.105.4.1855.
- Dmitrieva, R. I., and Doris, P. A. (2003) Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 28160-28166, doi: 10.1074/jbc.M303768200.
- Pierre, S., Compe, E., Grillasca, J. P., Plannells, R., Sampol, J., Pressley, T. A., and Maixent, J. M. (2001) RT-PCR detection of Na,K-ATPase subunit isoforms in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC): evidence for the presence of alpha1 and beta3, *Cell. Mol. Biol.*, **47**, 319-324.
- Zahler, R., Sun, W., Ardito, T., and Kashgarian, M. (1996) Na-K-ATPase alpha-isoform expression in heart and vascular endothelia: cellular and developmental regulation, *Am. J. Physiol.*, **270**, 361-371, doi: 10.1152/ajp-cell.1996.270.1.C361.
- Orlov, S. N., Klimanova, E. A., Tverskoi, A. M., Vladychenskaya, E. A., Smolyaninova, L. V., and Lopina, O. D. (2017) Na^{+} , K^{+} -dependent and -independent signaling triggered by cardiotonic steroids: facts and artifacts., *Mol. Basel Switz.*, **22**, 635, doi: 10.3390/molecules22040635.
- Riganti, C., Campia, I., Kopecka, J., Gazzano, E., Doublier, S., Aldieri, E., Bosia, A., and Ghigo, D. (2011) Pleiotropic effects of cardioactive glycosides, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 872-885, doi: 10.2174/092986711794927685.
- Dvela, M., Rosen, H., Feldmann, T., Nesher, M., and Lichtstein, D. (2007) Diverse biological responses to different cardiotonic steroids, *Pathophysiology*, **14**, 159-166, doi: 10.1016/j.pathophys.2007.09.011.
- Katz, A., Lifshitz, Y., Bab-Dinitz, E., Kapri-Pardes, E., Goldshleger, R., Tal, D. M., and Karlisch, S. J. D. (2010) Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19582-19592, doi: 10.1074/jbc.M110.119248.
- Тверской А. М., Локтева В. А., Орлов С. Н., Лопина О. Д. (2019) Изменение конформации резистентной и чувствительной к кардиотоническим стероидам α 1-Na,K-АТРазы при связывании убаина, дигоксина и маринобуфагенина, *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, **1**, 181-185.
- Reich, H., Tritschler, D., Herzenberg, A. M., Kassiri, Z., Zhou, X., Gao, W., and Scholey, J. W. (2005) Albumin activates ERK via EGF receptor in human renal epithelial cells, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 1266-1278, doi: 10.1681/ASN.2004030222.
- Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427, doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2.
- Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S. V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) Inversion of the intracellular Na^{+}/K^{+} ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16545-16552, doi: 10.1074/jbc.274.23.16545.
- Pchejetski, D., Taurin, S., Der Sarkissian, S., Lopina, O. D., Pshezhetsky, A. V., Tremblay, J., deBlois, D., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2003) Inhibition of Na^{+} , K^{+} -ATPase by

- ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the $[Na^+]/[K^+]_i$ ratio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 735-744, doi: 10.1016/s0006-291x(02)03002-4.
24. Shiyani, A. A., Sidorenko, S. V., Fedorov, D., Klimanova, E. A., Smolyaninova, L. V., Kapilevich, L. V., Grygorczyk, R., and Orlov, S. N. (2019) Elevation of intracellular Na^+ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage, *Cell. Physiol. Biochem.*, **53**, 638-647, doi: 10.33594/000000162.
 25. Wickham, H. (2009) Ggplot2: elegant graphics for data analysis, 2nd edn., Springer Publishing Company, Incorporated.
 26. Akimova, O. A., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2007) $[Na^+]/[K^+]_i$ -independent death of ouabain-treated renal epithelial cells is not mediated by Na^+, K^+ -ATPase internalization and de novo gene expression, *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.*, **455**, 711, doi: 10.1007/s00424-007-0283-6.
 27. Palmer, R. F., Lasseter, K. C., and Melvin, S. L. (1966) Stimulation of Na^+ and K^+ dependent adenosine triphosphatase by ouabain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 629-633, doi: 10.1016/0003-9861(66)90240-2.
 28. Godfraind, T., and Ghysel-Burton, J. (1977) Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump, *Nature*, **265**, 165, doi: 10.1038/265165a0.
 29. Klimanova, E. A., Petrushanko, I. Y., Mitkevich, V. A., Anashkina, A. A., Orlov, S. N., Makarov, A. A., and Lopina, O. D. (2015) Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na, K -ATPase and depends on the enzyme conformation, *FEBS Lett.*, **589**, 2668-2674, doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.011.
 30. Aydemir-Koksoy, A., Abramowitz, J., and Allen, J. C. (2001) Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Biol. Chem.*, **276**, 46605-46611, doi: 10.1074/jbc.M106178200.
 31. Abramowitz, J., Dai, C., Hirschi, K., Dmitrieva, R. I., Doris, P. A., Liu, L., and Allen, J. C. (2003) Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5, *Circulation*, **108**, 3048-3053, doi: 10.1161/01.CIR.0000101919.00548.86.
 32. Li, M., Wang, Q., and Guan, L. (2007) Effects of ouabain on proliferation, intracellular free calcium and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells, *J. Comp. Physiol.*, **177**, 589-595, doi: 10.1007/s00360-007-0157-4.
 33. Chueh, S. C., Guh, J. H., Chen, J., Lai, M. K., and Teng, C. M. (2001) Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells, *J. Urol.*, **166**, 347-353, doi: 10.1016/S0022-5347(05)66157-5.
 34. Khundmiri, S. J., Metzler, M. A., Ameen, M., Amin, V., Rane, M. J. and Delamere, N. A. (2006) Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, 1247-1257, doi: 10.1152/ajpcell.00593.2005.
 35. Saunders, R. and Scheiner-Bobis, G. (2004) Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1054-1062, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04012.x.
 36. Qiu, J., Gao, H.-Q., Zhou, R.-H., Liang, Y., Zhang, X.-H., Wang, X.-P., You, B.-A., and Cheng, M. (2007) Proteomics analysis of the proliferative effect of low-dose ouabain on human endothelial cells., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 247-253, doi: 10.1248/bpb.30.247.
 37. Tverskoi, A. M., Sidorenko, S. V., Klimanova, E. A., Akimova, O. A., Smolyaninova, L. V., Lopina, O. D., and Orlov, S. N. (2016) Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na^+, K^+ -ATPase activity and intracellular ratio of Na^+ and K^+ , *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 876-883, doi: 10.1134/S0006297916080083.
 38. Bolivar, J. J., Lazaro, A., Fernandez, S., Stefani, E., Pena-Cruz, V., Lechene, C., and Cerejido, M. (1987) Rescue of a wild-type MDCK cell by a ouabain-resistant mutant, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **253**, 151-161, doi: 10.1152/ajpcell.1987.253.1.C151.
 39. Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Pchejetski, D., Taurin, S., Farhat, N., Tremblay, J., Thorin, E., and Hamet, P. (2004) Na^+/K^+ pump and endothelial cell survival: $[Na^+]/[K^+]_i$ -independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of $[Na^+]/[K^+]_i$, *Pflug. Arch.*, **448**, 335-345, doi: 10.1007/s00424-004-1262-9.
 40. Orlov, S. N., and Hamet, P. (2005) Apoptosis vs. oncosis: role of cell volume and intracellular monovalent cations. In cell volume and signaling (Lauf, P. K., and Adragna, N. C., eds) Springer, US, pp. 219-233, doi: 10.1007/0-387-23752-6_21.
 41. Trevisi, L., Visentin, B., Cusinato, F., Pighin, I., and Luciani, S. (2004) Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 716-721, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.027.
 42. Askari, A. (2019) The sodium pump and digitalis drugs: dogmas and fallacies, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **7**, e00505, doi: 10.1002/prp2.505.
 43. Akimova, O. A., Bagrov, A. Y., Lopina, O. D., Kamernitsky, A. V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2005) Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na^+ and $[Na^+]/[K^+]_i$ -independent signaling in C7-MDCK cells, *J. Biol. Chem.*, **280**, 832-839, doi: 10.1074/jbc.M411011200.
 44. Campia, I., Gazzano, E., Pescarmona, G., Ghigo, D., Bosia, A. and Riganti, C. (2009) Digoxin and ouabain increase the synthesis of cholesterol in human liver cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 1580-1594, doi: 10.1007/s00018-009-9018-5.
 45. Campia, I., Sala, V., Kopecka, J., Leo, C., Mitro, N., Costamagna, C., Caruso, D., Pescarmona, G., Crepaldi, T., and Ghigo, D. et al. (2012) Digoxin and ouabain induce the efflux of cholesterol via liver X receptor signalling and the synthesis of ATP in cardiomyocytes, *Biochem. J.*, **447**, 301-311, doi: 10.1042/BJ20120200.
 46. Sidorenko, S., Klimanova, E., Milovanova, K., Lopina, O. D., Kapilevich, L. V., Chibalin, A. V., and Orlov, S. N. (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of Ca^{2+} -mediated and Ca^{2+} -independent signaling and elevated $[Na^+]/[K^+]_i$ ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72-86, doi: 10.1016/j.ceca.2018.09.007.
 47. Klimanova, E. A., Tverskoi, A. M., Koltsova, S. V., Sidorenko, S. V., Lopina, O. D., Tremblay, J., Hamet, P., Kapilevich, L. V., and Orlov, S. N. (2017) Time- and dose-dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na^+ and K^+ : a comparative analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 45403, doi: 10.1038/srep45403.

OUABAIN AND MARINOBUFAGENIN: A POSSIBLE PHYSIOLOGICAL EFFECTS ON HUMAN EPITHELIAL AND ENDOTHELIAL CELLS

**E. A. Klimanova*, D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko,
P. A. Abramicheva, O. D. Lopina, and S. N. Orlov**

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Received December 19, 2019

Revised February 18, 2020

Accepted February 18, 2020

Longtime study focused on the search of Na,K-ATPase (NKA) endogenous inhibitors of mammalian tissues resulted in the purification of ouabain, marinobufagenin (MBG) and other cardiotonic steroids (CTS) from blood plasma. Production of ouabain and MBG is known to increase during essential hypertension and other diseases coupled to hypervolemia. We carried out comparative analysis of the effect of these two CTS on the Na,K-ATPase activity measured as transport of Na^+ , K^+ , and Rb^+ , proliferation and death of human renal epithelial cells (HREC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) expressing $\alpha 1$ -Na,K-ATPase. Ouabain concentrations which provide half-maximal inhibition of Rb^+ influx (IC_{50}) into HREC and HUVEC were 0,07 μM . In both types of cells, the values of IC_{50} for MBG were by a factor of 10 higher than for ouabain. Incubation of HREC and HUVEC with ouabain in the range of concentrations 0,001-0,01 μM for 30 h led to the growth of [^3H]-thymidine incorporation into DNA by 40%, further increase of ouabain concentration up to 0,1 μM completely suppressed DNA synthesis. MBG at concentration 0,1 μM activated DNA synthesis by 25% in HREC, but not in HUVEC; 1 μM MBG completely inhibited DNA synthesis in HREC, and by 50% in HUVEC. In contrast to HREC, HUVEC incubation in free serum media provoked apoptosis, which was almost completely suppressed by ouabain and MBG at concentrations 0,1 and 3 μM respectively. Taking into account all these data we can conclude: 1) in HREC and HUVEC MBG effects at concentrations detected in blood plasma ($< 0,01 \mu\text{M}$) are not due to the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -ratio change; 2) ouabain effect on these cells in physiological concentrations range is mediated probably by activation of Na,K-ATPase that leads to cell proliferation.

Keywords: ouabain, marinobufagenin, Na,K-ATPase, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -ratio, epithelium, endothelium

УДК 577.152.313

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ И ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* ПРИ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PPN2*

© 2020 Л.П. Рязанова¹, Л.А. Ледова¹, Н.А. Андреева¹, А.Н. Звонарев¹,
М.А. Эльдаров², Т.В. Кулаковская^{1*}

¹ Пушчинский научный центр биологических исследований,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: alla@ibpm.pushchino.ru

² ФИЦ биотехнологии, Институт биоинженерии РАН, 117312 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.01.2020

После доработки 15.02.2020

Принята к публикации 17.02.2020

Исследовано влияние сверхпродукции дрожжевой эндополифосфатазы Ppn2 на метаболизм неорганических полифосфатов у *Saccharomyces cerevisiae*. Экспрессия гена *PPN2* в дрожжах под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PGK1*) приводила к значительному повышению эндополифосфатазной активности, стимулируемой ионами кобальта/цинка. Эта активность была более выражена с длинноцепочечными полифосфатами, стимулировалась ADP и присутствовала как в растворимой, так и грубой мембранной фракциях. Содержание короткоцепочечных полифосфатов в клетках штамма-трансформанта увеличилось в ~ 2,5 раза по сравнению с родительским штаммом. Штамм с сверхэкспрессией Ppn2 более устойчив к перекиси и щелочи. Обсуждается роль короткоцепочечных полифосфатов в адаптации к этим неблагоприятным факторам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифосфат, полифосфатаза, ген *PPN2*, сверхэкспрессия, *Saccharomyces cerevisiae*.

DOI: 10.31857/S0320972520040120

Неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, представляют собой регуляторные биополимеры, которые присутствуют в клетках как прокариот, так и эукариот [1–4]. Система деградации полиР у дрожжей состоит из нескольких ферментов, различающихся по своей локализации, физико-химическим свойствам и функциональному значению [5–10]. Эти ферменты различаются по преобладанию экзополифосфатазной или эндополифосфатазной активностей, благодаря чему по-разному воздействуют на полиР. Экзополифосфатаза (полифосфат фосфогидролаза, КФ 3.6.1.11) отщепляет Р с конца полимерной цепи, а эндополифосфатаза (полифосфат деполимераза, КФ 3.6.1.10.) расщепляет длинноцепочечные полиР на более короткоцепочечные, вплоть до триполифосфата. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* известны четыре белка, обладающих полифосфатазной активностью: Ppx1 [5, 6], Ppn1 [7, 8], Ddp1 [9] и Ppn2 [10]. Эти белки характеризуются разным соот-

ношением экзо- и эндополифосфатазной активности [11], не имеют сходства по аминокислотной последовательности и относятся к разным семействам, согласно базам данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) и SGD (<https://www.yeastgenome.org/>). Известно, что клетки двойного нокаут-мутанта по генам *PPX1* и *PPN1* способны использовать свои полиР для роста при голодании по фосфату [12]. Следовательно, Ddp1 и Ppn2 способны компенсировать отсутствие двух других полифосфатаз. В связи с такой мультикомпонентностью и возможной взаимозаменяемостью в системе катаболизма полиР у дрожжей, использование нокаут-мутантов по каждому из генов, кодирующих полифосфатазы, не достаточно для изучения функций этих ферментов. Еще одним подходом, позволяющим судить о функциональном значении отдельных полифосфатаз, является получение штаммов, сверхэкспрессирующих эти ферменты. Используя данный подход, мы показали, что сверхэкспрессия Ppx1 не влияет на длину цепи и количество полиР [13], сверхэкспрессия Ppn1 [14] и Ddp1 [15] приводит к изменениям в количестве и длине цепи полиР, в сверхэкспрессии Ppn1 влияет на стрессовые ответы [16]. Эндопо-

Принятые сокращения: полиР — неорганические полифосфаты.

* Адресат для корреспонденции.

лифосфатаза *Prp2* открыта относительно недавно [10] и предполагается, что основная ее функция — это деполимеризация полиР в вакуолях, где локализован этот фермент.

Целью настоящей работы была оценка влияния сверхэкспрессии гена *PPN2* на метаболизм полифосфатов и устойчивость к некоторым видам стресса у *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей. Штамм CRN с инактивированным геном *PPN1* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1*) [7] использовали в качестве родительского штамма. Применение штамма, дефектного по гену *PPN1*, связано с тем, что штамм дикого типа при попытках ввести в него векторы, содержащие гены полифосфатаз, имел очень слабую жизнеспособность. Штамм CRN/*PPN2*, сверхэкспрессирующий ген *PPN2* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1 pMB1_PPN2 Sc*), получали согласно методу, подробно описанному ранее [14]. Создание экспрессионного вектора *pMB1* с «кассетой экспрессии», состоявшей из сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PGK1*) и терминатора фосфосфоглицераткиназы (*TDH*) *S. cerevisiae*, описано в той же работе [14].

Конструирование вектора экспрессии гена *PPN2*. Кодировующую последовательность гена *PPN2* получали методом ПЦР на матрице геномной ДНК штамма CRN с помощью Phuzion ДНК полимеразы («New England Biolabs», США) и праймеров *PPN2_F* (5'-GGACATGTCTGAAGATAAGCGGAAAAGACGAG-3') и *PPN2_R* (5'-GGTCTCGAGTGTTTTAAGAGCATTTGACTTGAATTA-3'). Праймеры выбирали с помощью сервиса PrimerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) на основании референсной последовательности гена *YNL217W* (Genbank ID NM_001183055.1). К последовательностям добавляли 5'-фланкирующие сайты *PciI* и *XhoI*. Полученный ПЦР фрагмент размером 1 т.п.н. после гидролиза *PciI* и *XhoI* встраивали в *NcoI/XhoI* вектор *pMB1g*. После проверки секвенированием препараты плазмидной ДНК с «корректными» вставками использовали для трансформации реципиентного штамма CRN методом электропорации. Отобранные на среде SD прототрофные по урацилу трансформанты проверяли дополнительно методом ПЦР на наличие вектора.

Условия культивирования. Штамм CRN подерживали на агаризованной синтетической минимальной среде YNB с добавлением урацила, а трансформант CRN/*PPN2* — на агаризо-

ванной синтетической минимальной среде YNB без урацила [14]. Среда содержала на 1 л: 6,7 г бакто-дрожжевых азотистых оснований («Difco», США), 20 г глюкозы, по 20 мг L-триптофана, L-гистидина, L-метионина и аденина и 60 мг L-лейцина. При выращивании штамма CRN дополнительно вносили урацил в концентрации 20 мг/л.

Для получения биомассы культуры выращивали при 29 °C на качалке при 145 об/мин до стационарной стадии роста в колбах с 200 мл среды YNB с урацилом и без урацила для штаммов CRN и CRN/*PPN2* соответственно. Затем пересевали на такие же среды, для посева брали аликвоты культуры с одинаковой концентрацией клеток. Эти культуры использовали для получения кривых роста, а клетки на стационарной стадии роста — для определения чувствительности к токсикантам и получения образцов биомассы для анализа. Кривые роста строили по оптической плотности при 595 нм в кюветах с толщиной оптического пути 0,3 см на спектрофотометре «Unico» (США). Концентрацию клеток в стационарной стадии роста оценивали с помощью подсчета в камере Горяева, а количество мертвых клеток — с помощью окраски пропидий йодидом и подсчета доли окрашенных клеток при флуоресцентной микроскопии.

Биомассу собирали центрифугированием при 4000 g, дважды промывали холодной дистиллированной водой.

Получение сферопластов и препаратов, содержащих *Prp2*. Для получения сферопластов биомассу промывали 0,8 М раствором маннита в 5%-ном цитратном буфере, pH 6,5, инкубировали в этом же буфере с лиофилизированным желудочным соком виноградных улиток (150 мг на 1 г биомассы) и дитиотреитолом (10 мг на 1 г биомассы) в течение 2 ч при 30 °C. Сферопласты промывали тем же буфером и разрушали при 4 °C в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, и 0,5 mM фенилметилсульфонилфторид («Sigma», США). Затем центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин, к осадку снова добавляли этот же буфер и обрабатывали в гомогенизаторе. Затем центрифугировали при тех же условиях. Объединенный супернатант центрифугировали при 13 000 g в течение 60 мин. Супернатант представлял собой бесклеточный экстракт, а осадок — грубую мембранную фракцию.

Для определения влияния двухвалентных катионов, ADP и ATP, а также эндополифосфатазной активности с полиР разной степени полимерности использовали препарат бесклеточного экстракта после высаливания при 85%-ном

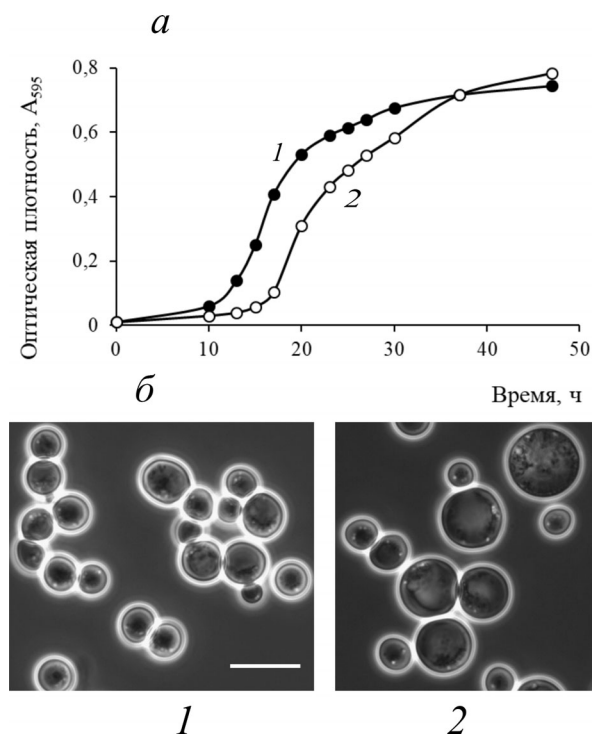


Рис. 1. *a* — Кривые роста штаммов CRN (1) и CRN/PPN2 (2) на среде YNB; *б* — микрофотографии (фазовый контраст) клеток родительского штамма CRN и штамма CRN/PPN2, выращенных в течение 36 ч на среде YNB, метка — 10 мкм. Представлены средние значения трех биологических повторностей.

насыщении сульфатом аммония. Сульфат аммония добавляли к бесклеточному экстракту до 50%-ного насыщения, выдерживали в течение 1 ч, затем удаляли балластные белки центрифугированием при 13 000 g 20 мин. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 85%-ного насыщения, выдерживали в течение 20 ч на холоду, затем осаждали при 14 000 g 1 ч и перерастворяли осадок в 25 mM Tris-HCl, pH 7,2, содержавшем 0,1%-ный Triton X-100.

Определение полифосфатазных активностей. Экзополифосфатазную активность определяли при 30 °C по скорости образования P [5]. Инкубационная среда содержала 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 2,5 mM MgSO₄ и 200 mM NH₄Cl. В качестве субстратов использовали 2,5 mM полиР со средней длиной цепи 188 фосфатных остатков (полиР₁₈₈) или 15 фосфатных остатков (полиР₁₅) («Monsanto», США). Концентрация полиР указана в соответствии с количеством P, образующимся при гидролизе полимера в 1 M HCl при 100° за 10 мин. ПолиР предварительно очищали от примесей пирофосфата и ортофосфата как описано ранее [5]. За единицу активности (Е) в случае экзополифосфатазной активности принимали количество фермента, образующего

1 мкмоль P за 1 мин. Концентрацию белка определяли с использованием БСА в качестве стандарта [17].

Эндополифосфатазную активность анализировали по уменьшению длины цепи полифосфатов (полиР₁₈₈ и полиР₁₅). Инкубационная среда (0,5–1 мл) содержала 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 200 mM NH₄Cl, 0,01–0,1 mM ZnCl₂, 2,5 mM, 9 mM полиР₁₈₈ либо 6,8 mM полиР₁₅. Время инкубации составляло 30 мин. Реакцию останавливали добавлением HClO₄ до концентрации 0,5 M. Дальнейшую подготовку образцов и электрофорез в 24%-ном ПААГ с 7 M мочевиной проводили как описано ранее [8].

Определение содержания полифосфатов в клетках. Для экстракции полиР применяли известный метод [18] с небольшими модификациями. Кислоторастворимую фракцию полиР получали двукратной обработкой биомассы 0,5 N HClO₄ при 0 °C в течение 15 мин при перемешивании. После отделения супернатанта оставшу-

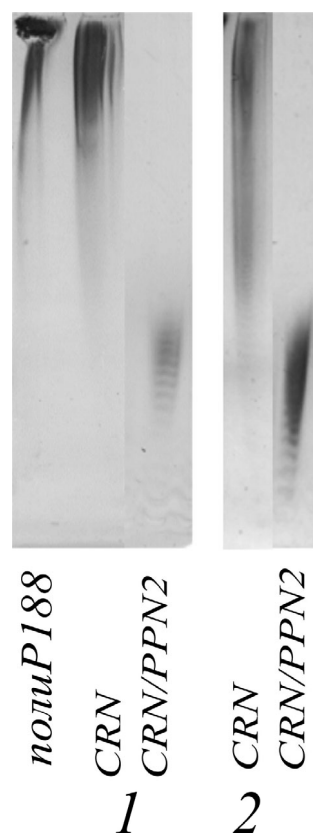


Рис. 2. Эндополифосфатазная активность в грубой мембранной фракции (1) и бесклеточном экстракте (2) штаммов CRN и CRN/PPN2. Активность определяли с использованием полиР₁₈₈ в качестве субстрата в присутствии 1 mM Zn²⁺. Содержание белка в образцах: 40 мкг (мембранная фракция CRN), 4 мкг (мембранная фракция, CRN/PPN2), 150 мкг (растворимая фракция, CRN), 13 мкг (растворимая фракция CRN/PPN2). Представлен результат двух биологических повторностей

юся биомассу дважды обрабатывали насыщенным раствором NaClO_4 при 0°C , супернатант после центрифугирования представлял собой солерастворимую фракцию полиР. Осадок обрабатывали дважды $0,05\text{ M NaOH}$, супернатант представлял собой щелочерастворимую фракцию. В полученных фракциях содержание полиР оценивали по лабильному фосфору. Количество оставшихся в биомассе кислотонерастворимых полифосфатов оценивали по содержанию Р после обработки биомассы $0,5\text{ N HClO}_4$ при 100°C в течение 20 мин. Количество Р определяли колориметрически [19].

Определение чувствительности штаммов к перекиси, щелочи, ионам кадмия. Чувствительность к Cd^{2+} , щелочи и перекиси определяли с помощью культивирования в планшетах на среде YPD, поскольку в среде YNB при добавлении этих реагентов выпадал осадок. Образцы культур, стандартизованных по концентрации клеток, добавляли в ячейки стерильного планшета с

крышкой, содержавшие среду YPD и аликвоты стерильного раствора $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, перекиси или KOH . После 24 ч культивирования оптическую плотность культур измеряли с помощью планшетного фотометра «Эфос» (Россия) при длине волны 600 нм.

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли трижды. На рисунках представлены средние значения со стандартным отклонением, полученные с помощью программы Excel. Электрофореграммы повторяли дважды, на рисунках представлены лучшие результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие у штамма CRN/PPN2 экспрессионного вектора, содержащего ген *PPN2*, приводило к изменению характера роста на минимальной среде по сравнению с исходным штаммом (рис. 1, а), скорость роста в логарифмической

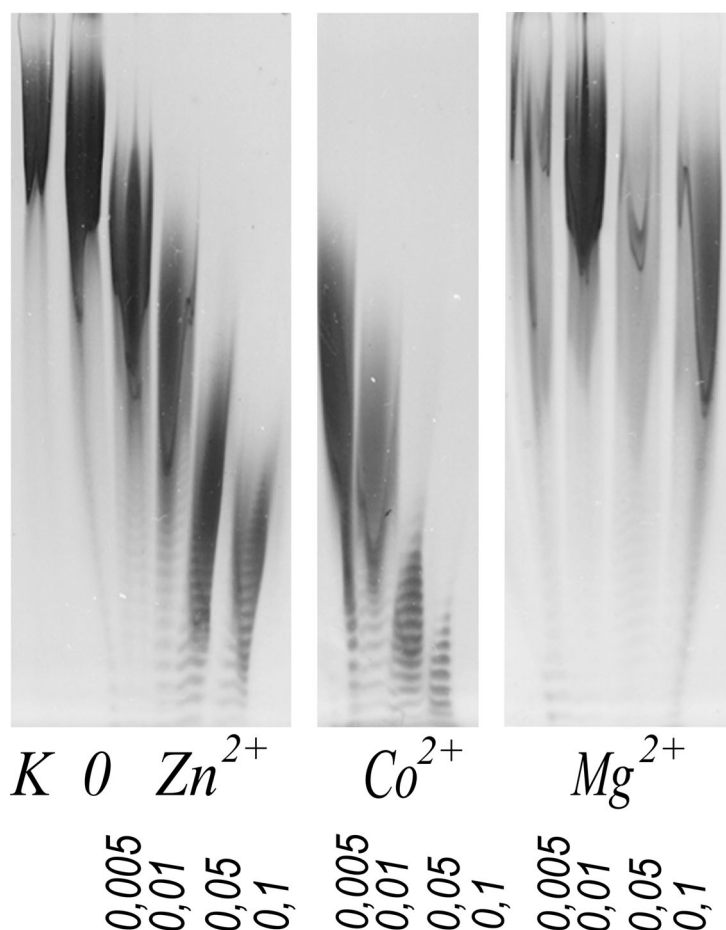


Рис. 3. Влияние двухвалентных катионов на эндополифосфатазную активность бесклеточного экстракта штамма CRN/PPN2 (препарат, полученный с помощью высаливания сульфатом аммония) с полиР₁₈₈ (9 мМ), в присутствии 200 мМ NH_4Cl , время инкубации 30 мин. К — контроль, без препарата белка, 0 — в отсутствии двухвалентных катионов, цифрами указаны концентрации двухвалентных катионов в мМ. Представлен результат двух биологических повторностей

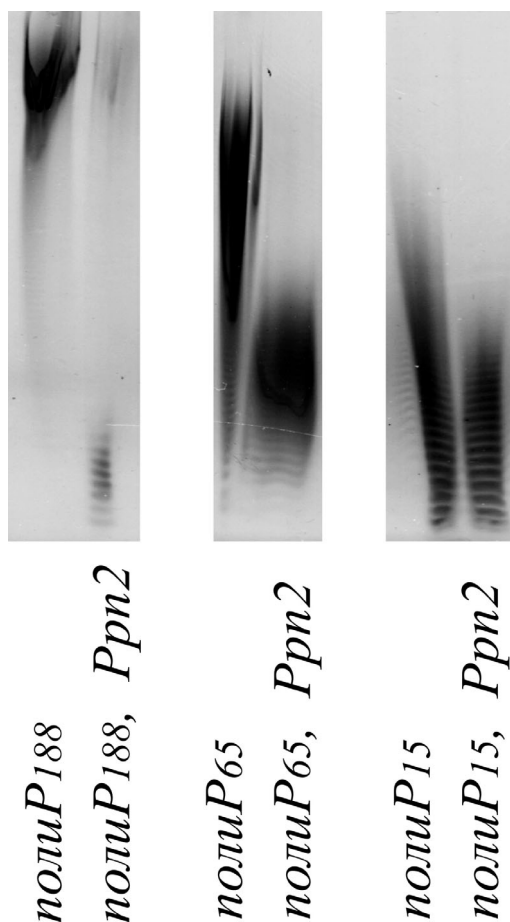


Рис. 4. Эндополифосфатазная активность бесклеточного экстракта CRN/PPN2 (препарат, полученный с помощью высаливания сульфатом аммония) с полиР различной степени полимерности, в инкубационной среде присутствовал 0,05 мМ Co^{2+} и 200 мМ NH_4Cl . ПолиР₁₈₈, полиР₆₅, полиР₁₅ — полиР со средней длиной цепи 188, 65 и 15 фосфатных остатков инкубировали в отсутствие препарата Ррп2. Представлен результат двух биологических повторностей

стадии была снижена ($0,28 \text{ ч}^{-1}$) по сравнению с родительским штаммом CRN ($0,376 \text{ ч}^{-1}$). Однако на стационарной стадии роста количество сырой биомассы, оптическая плотность культуры (рис. 1, а) и концентрация клеток у обоих штаммов становились близкими. В популяции штамма CRN/PPN2 присутствовало много клеток увеличенного размера и измененной формы (рис. 1, б). По-видимому, увеличение размера клеток объясняет изменение соотношения между величинами сухой и сырой биомассы: 1 г сухой биомассы соответствовал 4,9 и 5,7 г сырой биомассы для клеток штаммов CRN и CRN/PPN2 соответственно. Оценку количества мертвых клеток на стационарной стадии роста у обоих штаммов проводили с помощью окраски пропидий йодидом, оно оказалось близким и не превышало 5–7%.

Известно, что Ррп2 проявляет эндополифосфатазную активность [6]. Проведено сравнение эндополифосфатазной активности бесклеточного экстракта и грубой мембранной фракции исходного штамма CRN, и штамма CRN/PPN2 в присутствии 1 мМ Zn^{2+} , оценивая их по уменьшению длины цепи полиР₁₈₈. У исходного штамма CRN отсутствует эндополифосфатаза Ррп1 [7], но имеется фермент Ddp1, проявляющий эндополифосфатазную активность. Эндополифосфатазная активность как в бесклеточном экстракте, так и в грубой мембранной фракции сверхпродуцента Ррп2 ожидаемо увеличилась (рис. 2). Отметим, что в норме фермент Ррп2 локализуется в вакуолях, тогда как у сверхпродуцента Ррп2 наблюдается появление его в растворимой форме. Подобный эффект наблюдали для штамма, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ррп1 под конт-

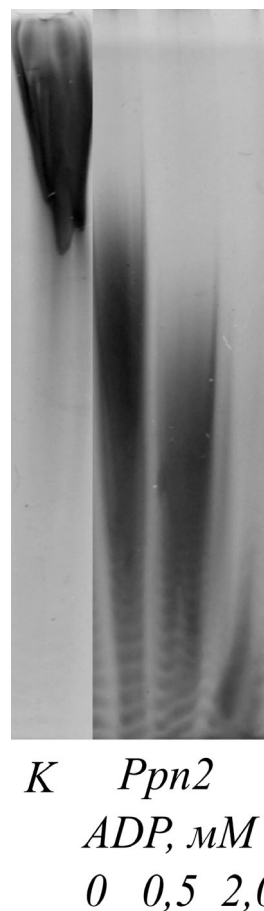


Рис. 5. Влияние ADP на эндополифосфатазную активность бесклеточного экстракта CRN/PPN2 PPN2 (препарат, полученный с помощью высаливания сульфатом аммония) с полиР₁₈₈ в присутствии 200 мМ NH_4Cl и 0,05 мМ CoSO_4 , время инкубации 30 мин. К — контроль, препарат Ррп2 не добавлен, Ррп2 — препарат добавлен. Представлен результат двух биологических повторностей

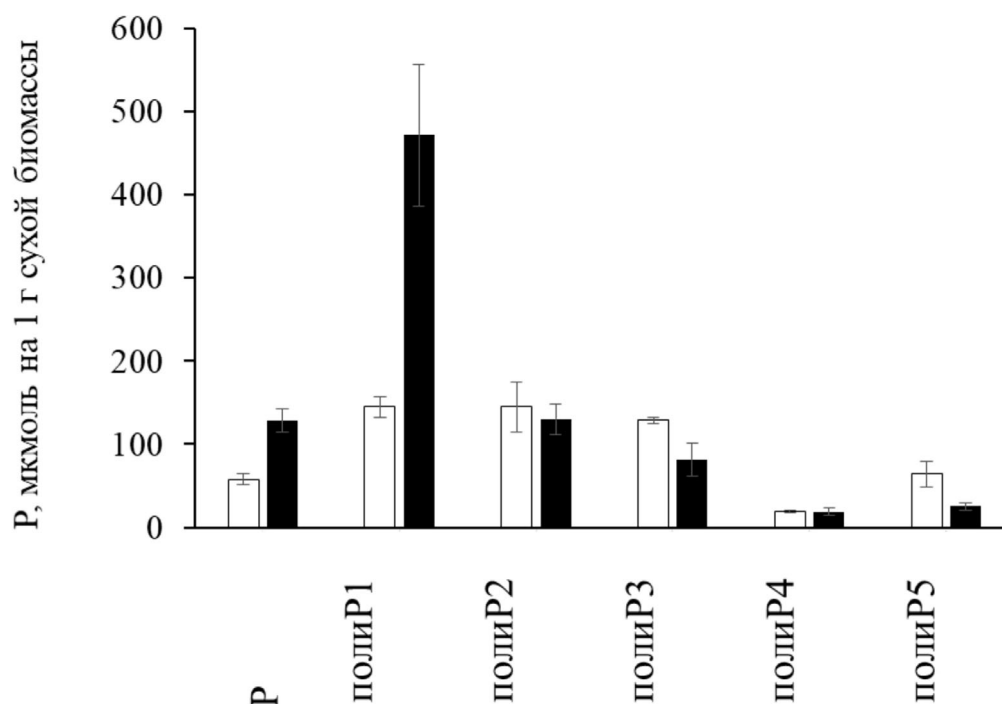


Рис. 6. Содержание ортофосфата (P) и полиР различных фракций в клетках штаммов *S. cerevisiae* CRN (белые столбцы) и CRN/PPN2 (черные столбцы) на стационарной стадии роста. Представлены средние значения трех биологических повторностей

ролем того же вектора, содержащего ген *PPN1* [20].

Мы изучили некоторые свойства эндополифосфатазной активности бесклеточного экстракта штамма CRN/PPN2, используя препарат, полученный из растворимой фракции после осаждения сульфатом аммония в условиях 85% насыщения. Экзополифосфатазная активность препарата была низкой и не превышала 3 мЕ на 1 мг белка. На рис. 3 показано влияние двухвалентных катионов на эндополифосфатазную активность такого препарата. Ионы Co^{2+} и Zn^{2+} стимулировали активность уже при 0,005 мМ, тогда как ионы Mg^{2+} были слабыми стимуляторами. Co^{2+} оказался более эффективным стимулятором, чем Zn^{2+} . Эта активность проявлялась как с длинноцепочечными полиР₁₈₈, так и с короткоцепочечными полиР₁₅, однако наиболее выраженной она была с полиР₁₈₈ (рис. 4). ADP оказывал стимулирующее воздействие (рис. 5), а АТР (2 мМ) не влиял на эту активность (не иллюстрируется).

Проведено сравнение содержания фосфата и полиР различных фракций в клетках стационарной стадии роста (рис. 6). Видно, что у штамма—трансформанта увеличилось содержание Р и наиболее короткоцепочечных полиР1 и снизилось содержание наиболее длинноцепочечных полиР3 и полиР5. Отметим также, что средняя

длина цепи полиР этих двух фракций у сверхпродуцента уменьшена по сравнению с клетками родительского штамма (рис. 7). В целом, сверхэкспрессия эндополифосфатазы Рpn2 привела к увеличению содержания короткоцепочечных полиР, что согласуется с субстратной специфичностью этого фермента (см. рис. 4).

Рассмотрим, какие еще физиологические особенности проявляются при сверхэкспрессии эндополифосфатазы Рpn2. Известно, что важную роль в устойчивости клеток дрожжей к Cd^{2+} играют кислоторастворимые низкополимерные полиР [21]. Однако, несмотря на увеличение содержания этих полиР у штамма, сверхэкспрессирующего Рpn2, по чувствительности к кадмию разницы между штаммами в диапазоне концентраций 0,01–0,1 мМ не обнаружено. Концентрация 0,05 мМ вызывала ~ 70% ингибирование роста у обоих штаммов. Штамм CRN/PPN2 оказался более устойчивым к воздействию щелочи и перекиси (рис. 8).

Итак, сверхэкспрессия полифосфатазы Рpn2 в клетках *S. cerevisiae* привела к увеличению эндополифосфатазной активности, зависимой от ионов цинка или кобальта, и наиболее активной в отношении длинноцепочечных полиР. Клетки штамма, сверхпродуцирующего Рpn2, содержат значительно больше фосфата и короткоцепочечных полиР1. Отметим, что штамм, сверхпроду-

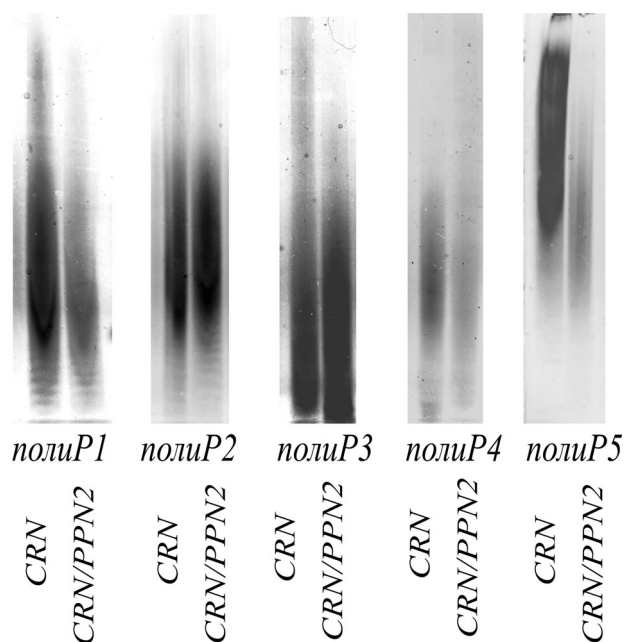


Рис. 7. Электрофорез фракций полиР, экстрагированных из клеток штаммов CRN и CRN/PPN2 *S. cerevisiae*, выращенных на среде YNB до стационарной стадии роста. Представлен результат двух биологических повторностей

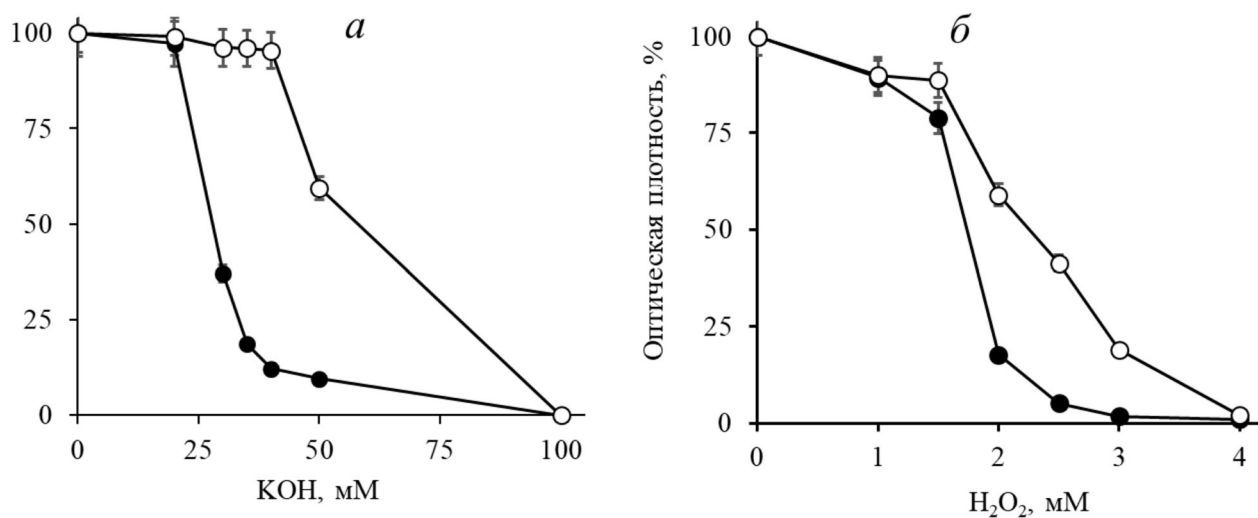


Рис. 8. Подавление роста штаммов CRN (черные кружки) и CRN/PPN2 (белые кружки) при культивировании в присутствии KOH и перекиси. Представлены средние значения трех биологических повторностей

цирующий полифосфатазу Prp1, характеризуется значительным снижением содержания как короткоцепочечных, так и длинноцепочечных полиР [14], а в клетках штаммов, сверхпродуцирующих полифосфатазы Prx1 [13] и Ddp1 [15], не было отмечено значительных изменений в содержании полиР по сравнению с родительским штаммом. Сравнение влияния сверхэкспрессии различных полифосфатаз на содержание полиР у *S. cerevisiae* свидетельствует в пользу представления о разной роли этих ферментов в мине-

ральном фосфорном обмене. Возможно, что увеличение содержания Р и низкополимерных полиР приводит к увеличению внутриклеточного осмотического давления и изменению формы и размера клеток у штамма CRN/PPN2 (рис. 1, б). Подобный эффект у других штаммов, сверхпродуцирующих полифосфатазы, не наблюдали.

Полученные данные позволяют уточнить роль Prp2 в условиях щелочного и окислительного стрессов. Предположено, что короткоцепочечные полиР, которые образуются в увели-

ченном количестве у штамма, сверхпродуцирующего эту полифосфатазу, повышают устойчивость к обоим воздействиям. Известно, что полиР могут выполнять роль «химических» шаперонов, предохраняющих белки от воздействия перекиси [22]. Низкополимерные полиР, обычно локализованные в цитоплазме [23], лучше гидролизуются полифосфатазой Prx1 и благодаря этому в клетке появляется больше Р для нейтрализации ионов OH^- . Полученный в данной работе штамм CRN/PPN2 представляет интерес

для дальнейшего исследования роли низкомолекулярных полиР в адаптационных реакциях клеток *S. cerevisiae*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rao, N. N., Gómez-García, M. R., and Kornberg, A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival, *Ann. Rev. Biochem.*, **78**, 605-647, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039.
2. Clotet, J. (2017) Polyphosphate: popping up from oblivion, *Curr. Genet.*, **63**, 15-18, doi: 10.1007/s00294-016-0611-5.
3. Baker, C. J., Smith, S. A., and Morrissey, J. H. (2018) Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation, *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, **3**, 18-25, doi: 10.1002/rth2.12162.
4. Xie, L., and Jakob, U. (2019) Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic protein scaffold, *J. Biol. Chem.*, **294**, 2180-2190, doi: 10.1074/jbc.REV118.002808.
5. Andreeva, N. A., and Okorokov, L. A. (1993) Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope, *Yeast*, **9**, 127-139.
6. Wurst, H., T. Shiba, T., and Kornberg, A. (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **177**, 898-906.
7. Sethuraman, A., Rao, N. N., and Kornberg, A. (2001) The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8542-8547.
8. Andreeva, N., Trilisenko, L., Eldarov, M., and Kulakovskaya, T. (2015) Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities, *PLoS One*, **10**, e0119594, doi: 10.1371/journal.pone.0119594.
9. Lonetti, A., Sziogyarto, Z., Bosch, D., Loss, O., Azevedo, C., and Saiardi, A. (2011) Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31966-31974, doi: 10.1074/jbc.M111.266320.
10. Gerasimait, R., and Mayer, A. (2017) Ppn2, a novel Zn^{2+} -dependent polyphosphatase in the acidocalcisome like yeast vacuole, *J. Cell. Sci.*, **130**, 1625-1636, doi: 10.1242/jcs.201061.
11. Andreeva, N., Ledova, L., Ryazanova, L., Tomashevsky, A., Kulakovskaya, T., and Eldarov, M. (2019) Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases, *Biochimie*, **163**, 101-107, doi: 10.1016/j.biochi.2019.06.001.
12. Lichko, L. P., Kulakovskaya, T. V., Kulakovskaya, E. V., and Kulaev, I. S. (2008) Inactivation of PPX1 and PPN1 genes encoding exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent utilization of polyphosphates as phosphate reserve, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 985-989, doi: 10.1134/s0006297908090046.
13. Lichko, L. P., Eldarov, M. A., Dumina, M. V., and Kulakovskaya, T. V. (2014) PPX1 gene overexpression has no influence on polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1211-1215, doi: 10.1134/S000629791411008X.
14. Eldarov, M. A., Baranov, M. V., Dumina, M. V., Shgun, A. A., Andreeva, N. A., Trilisenko, L. V., Kulakovskaya, T. V., Ryazanova, L. P., and Kulaev, I. S. (2013) Polyphosphates and exopolyphosphatase activities in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under overexpression of homologous and heterologous PPN1 genes, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 946-953, doi: 10.1134/S0006297913080129.
15. Trilisenko, L. V., Andreeva, N. A., Eldarov, M. A., Dumina, M. V., and Kulakovskaya, T. V. (2015) Polyphosphates and polyphosphatase activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during overexpression of the DDP1 gene, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1312-1317, doi: 10.1134/S0006297915100120.
16. Trilisenko, L., Zvonarev, A., Valiakhmetov, A., Penin, A. A., Eliseeva, I. A., Ostroumov, V., Kulakovskiy, I. V., and Kulakovskaya, T. (2019) The reduced level of inorganic polyphosphate mobilizes antioxidant and manganese-resistance systems in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cells*, **8**, 461, doi: 10.3390/cells8050461.
17. Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials, *Anal. Biochem.*, **70**, 241-250.
18. Vagabov, V. M., Trilisenko, L. V., and Kulaev I. S. (2000) Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 349-355.
19. Kulakovskaya, T. V., Andreeva, N. A., Karpov, A. V., Sidorov, I. A., and Kulaev, I. S. (1999) Hydrolysis of tripolyphosphate by purified exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* cytosol: kinetic model, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 990-993.
20. Andreeva, N., Trilisenko, L., Kulakovskaya, T., Dumina, M., and Eldarov, M. (2015) Purification and properties of recombinant exopolyphosphatase PPN1 and effects of its overexpression on polyphosphate in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 52-56, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.006.
21. Trilisenko, L., Kulakovskaya, E., and Kulakovskaya, T. (2017) The cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* depends on inorganic polyphosphate, *J. Basic Microbiol.*, **57**, 982-986, doi: 10.1002/jobm.201700257.
22. Gray, M. J., and Jakob, U. (2015) Oxidative stress protection by polyphosphate-new roles for an old player, *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 1-6, doi: 10.1016/j.mib.2014.12.004.
23. Lichko, L., Kulakovskaya, T., Pestov, N., and Kulaev, I. (2006) Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes, *Biosci. Rep.*, **26**, 45-54, doi: 10.1007/s10540-006-9003-2.

**INORGANIC POLYPHOSPHATE AND THE PECULIARITIES
OF PHYSIOLOGY UNDER OVEREXPRESSION
OF *PPN2* GENE IN *Saccharomyces cerevisiae***

**L. P. Ryazanova¹, L. A. Ledova¹, N. A. Andreeva¹,
A. N. Zvonarev¹, M. A. Eldarov², and T. V. Kulakovskaya^{1*}**

¹ Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,
Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia; E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru

² Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia

Received January 29, 2020

Revised February 15, 2020

Accepted February 17, 2020

The effect of the overproduction of yeast endopolyphosphatase Ppn2 on the metabolism of inorganic polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* was studied. The expression of the *PPN2* gene in yeast under the control of the strong constitutive promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*PGI*) led to a significant increase in endopolyphosphatase activity, stimulated by cobalt/zinc ions. This activity was higher with long chain polyphosphates, it was stimulated by ADP, and was present in both soluble and membrane subcellular fractions. The content of short-chained polyphosphates in the cells of overexpressing strain increased ~2.5 times as compared with the parent strain. The strain with overexpression of Ppn2 was more resistant to peroxide and alkali. The role of short chained polyphosphates in adaptation to these stress factors is discussed.

Keywords: inorganic polyphosphate, polyphosphatase, *PPN2* gene, overexpression, *Saccharomyces cerevisiae*

ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ И ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ ИСТОРИИ БИОХИМИИ 2020 Г.*

175 лет — проведение одного из первых исследований свертывания крови (А. Buchanan, 1845).

125 лет — открытие физиологического действия экстрактов надпочечников (адреналина и адреналиноподобных веществ) (N. Cybulski, 1895).

100 лет — открытие дыхательных энзимов (O. Warburg, 1920).

75 лет — установление структуры инсулина (F. Sanger, 1945–1956).

21 февраля — 125 лет со дня рождения Хенрика Дама (C.P.H. Dam, 1895–1976), датского биохимика, почётного президента Международного союза по изучению питания. Внес вклад в исследование витамина Е и жирового обмена. За открытие витамина К удостоен Нобелевской премии (1943, совместно с Э. Дойзи).

Соч. и лит.: БМЭ и БСЭ, 3-е изд.

14 июня — 100 лет со дня рождения Анатолия Николаевича Климова (1920–2011, род. в селе Шелтозерово Шелтозерского района Карельской АССР), российского биохимика, академика РАМН. В 1963–1969 гг. — директор Института антибиотиков, с 1961 г. — заведующий лабораторией липидного обмена Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН. Научные работы посвящены вопросам биохимии антибиотиков и липидного обмена. Работал над созданием новых отечественных длительно действующих препаратов пенициллина и внедрением их в практику здравоохранения. Провел исследования биохимических и иммунобиохимических механизмов развития атеросклероза. Открыл но-

вый изоэнзим гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы, играющий ключевую роль в регуляции скорости биосинтеза холестерина. Автор аутоиммунной теории патогенеза атеросклероза.

Соч.: БМЭ, 3-е изд.; Липопротеиды, дислипопротеидемии и атеросклероз, Медицина, Ленинград, 1984, с. 166 (совместно с Н.Г. Никульчевой); Эпидемиология и факторы риска ишемической болезни сердца (1989), Медицина, Ленинград, с. 174 (совместно с др.).

20 ноября — 125 лет со дня рождения Элберта Бейрда Хэйстингса (Гастингса, А. Baird Hastings, 1895–1987), американского биохимика, члена Национальной АН (США), президента Американского общества биохимиков (1945–1947). Внёс вклад в разработку микрометодов измерения кислотно-щелочного равновесия. Исследовал сахарный обмен, физиологию утомления, межточный обмен до и после воздействия изотопов. Был редактором журналов «Journal of Biological Chemistry» (1941–1959), «Endocrinology» (1963) и др. Ему посвящен фильм в серии «Выдающиеся люди в медицине» (США).

Соч.: The physiology of fatigue, Washington, 1921; Intermediary metabolism before and after isotopes (1964) *Ann. Intern. Med.*, 11, с. 966–974; Effect of environmental CO₂ and pH on glycerol metabolism by rat liver *in vitro* (1964) *J. Biol. Chem.*, 1100–1704.

Лит.: Encyclopedia Americana, Danbury (USA) (1992) Vol. 13; Great men in medicine (1972) *Bull. Hist. Med.*, Vol. 46, p. 309; World who's who in science (1968) Chicago.

* Составители: ведущий научный сотрудник, к.и.н. Егорышева И.В., старший научный сотрудник, к.и.н. Шерстнева Е.В. (Отдел истории медицины и здравоохранения ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко»); электронная почта: otdelistorii@rambler.ru

ОПЕЧАТКИ, ЗАМЕЧЕННЫЕ В ЖУРНАЛЕ «БИОХИМИЯ», том 84, вып. 4, 2019

Страница	Столбец	Строка	Напечатано	Следует читать
517	правый, раздел «Финансирование»	11 сверху	Работа выполнена в рамках госзадания АААА_А17_117030110140_5 при частичной поддержке РФФИ (проекты 17_00_00218(К) и 17_44_500828).	Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А17-117030110140-5 при частичной поддержке РФФИ (проекты 17-00-00207(К) и 17-44-500828).

ОПЕЧАТКИ, ЗАМЕЧЕННЫЕ В ЖУРНАЛЕ «БИОХИМИЯ», том 84, вып. 5, 2019

Страница	Столбец	Строка	Напечатано	Следует читать
743	правый, раздел «Финансирование»	19 сверху	№ 17-00-0207 (К)	№ 17-00-00207 (К)