СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 10, 2020

«ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ»
(спецвыпуск)
Ответственный редактор Б. Животовский

Программируемая гибель клеток: исторические заметки из России (мини-обзор)
Б. Животовский 1323

Математическое моделирование демонстрирует влияние состава филаментов DED на активность малых молекул, нацеленных на гетеродимер каспаза-8/c-$FLIP_L$
Н.В. Иванисенко, И.Н. Лаврик 1331

Проблема обратимости апоптотических процессов (обзор)
И.И. Захаров, М.А. Савицкая, Г.Е. Онищенко 1344

Трансглутаминаза 2-го типа участвует в регуляции гомеостаза гемопоэтических стволовых клеток
С. Оливерио, Дж.С.О. Бельтран, Л. Оккигросси, В. Бордони, К. Аграти, М. Д'Элетто, Ф. Россин, П. Борелли, Г.П. Амаранте-Мендес, О. Демидов, Н.А. Барлев, М. Пьячентини 1361

Репликативное старение и экспрессия генов аутофагии в мезенхимальных стромальных клетках
А.Ю. Ратушный, Ю.В. Рудимова, Л.Б. Буравкова 1372

НЕТоз: молекулярные механизмы, роль в физиологии и патологии (обзор)
Н.В. Воробьева, Б.В. Черняк 1383

Вирусные инфекции: негативный регулятор апоптоза и фактор онкогенности (обзор)
А.В. Замараев, Б. Животовский, Г.С. Копеина 1398

Молекулярные механизмы и функции p73, представителя семейства белков p53 (мини-обзор)
Дж. Мелино 1411

Таргетирование белков семейства Bcl-2: что, где, когда? (обзор)
В.В. Сеничкин, Н.В. Первушин, А.П. Зуев, Б. Животовский, Г.С. Копеина 1421

Нарушение координированной регуляции экспрессии BIF-1, BAX и Beclin-1 при первичной и метастатической меланоме
Ж. Франгеж, С.М.С. Джафари, Р.Е. Хангер, Г.-У. Симон 1442

Деградация Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ происходит независимо от аутофагии
Н.В. Первушин, В.В. Сеничкин, А.А. Капуста, А.С. Горбунова, В.О. Каминский, Б. Животовский, Г.С. Копеина 1452

BNIP3 как регулятор цисплатин-индуцированного апоптоза
А.С. Горбунова, Т.В. Денисенко, М.А. Япрынцева, А.Д. Пивнюк, Т.А. Приказчикова, В.Г. Гогвадзе, Б. Животовский 1464

Активные формы кислорода и антиоксиданты в канцерогенезе и терапии опухолей (обзор)
С.М. Вострикова, А.Б. Гринев, В.Г. Гогвадзе 1474

Программируемая клеточная смерть и функциональная активность тромбоцитов при онкогематологических заболеваниях
А.А. Мартьянов, А.А. Игнатова, Г.С. Свидельская, Е.А. Пономаренко, С.П. Гамбарян, А.Н. Свешникова, М.А. Пантелеев 1489

Участие тирозинкиназного рецептора ERBB2/HER2 в регуляции клеточной смерти (обзор)
А.А. Дакс, О.А. Федорова, О.Ю. Шувалов, С.Е. Парфеньев, Н.А. Барлев 1500

CONTENTS

Vol. 85, Publ. 10, 2020

PROGRAMMED CELL DEATH IN BIOLOGY AND MEDICINE
(Special Issue)
Guest Editor B. Zhivotovsky

Programmed Cell Death: Historical Notes from Russia (Mini-Review)
B. Zhivotovsky 1323

Mathematical Modeling Reveals a Role for the Composition of DED Filaments in the Effects of Small Molecules Targeting Caspase-8/c-$FLIP_L$ Heterodimer
N. V. Ivanisenko and I. N. Lavrik 1331

The Problem of Apoptotic Processes Reversibility (Review)
I. I. Zakharov, M. A. Savitskaya, and G. E. Onischenko 1344

Transglutaminase Type 2 Is Involved in the Hematopoietic Stem Cells Homeostasis
S. Oliverio, J.S.O. Beltran, L. Occhigrossi, V. Bordoni, C. Agrati, M. D'Eletto, F. Rossin, P. Borelli, G. P. Amarante-Mendes, O. Demidov, N. A. Barlev, and M. Piacentini 1361

Senescence and Autophagy Gene Expression in Mesenchymal Stromal Cells
A. Ratushnyy, Y. Rudimova, and L. Buravkova 1372

NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology (Review)
N. V. Vorobjeva and B. V. Chernyak 1383

Viral Infections: Negative Regulator of Apoptosis and Factor of Oncogenicity (Review)
A. V. Zamaraev, B. Zhivotovsky, and G. S. Kopeina 1398

Molecular Mechanisms and Function of the p53 Family Member p73 (Mini-Review)
G. Melino 1411

Targeting Bcl-2 Family Proteins: What, Where, When? (Review)
V. V. Senichkin, N. V. Pervushin, A. P. Zuev, B. Zhivotovsky, and G. S. Kopeina 1421

Loss of Concurrent Regulation of the Expression of BIF-1, BAX and Beclin-1 in Primary and Metastatic Melanoma
Ž. Frangež, S. M. Seyed Jafari, R. E. Hunger, and H.-U. Simon 1442

Nutrient Deprivation Promotes Mcl-1 Degradation in an Autophagy-Independent Manner
N. V. Pervushin, V. V. Senichkin, A. A. Kapusta, A. S. Gorbunova, V. O. Kaminskyy, B. Zhivotovsky, and G. S. Kopeina 1452

BNIP3 as a Regulator of Cisplatin-Induced Apoptosis
A. S. Gorbunova, T. V. Denisenko, M. A. Yapryntseva, A. D. Pivnyuk, T. A. Prikazchikova, V. G. Gogvadze, and B. Zhivotovsky 1464

Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Carcinogenesis and Tumor Therapy (Review)
S. M. Vostrikova, A. B. Grinev, and V. G. Gogvadze 1474

Programmed Cell Death and Functional Activity of Platelets in Case of Oncohematologic Diseases
A. A. Martyanov, A. A. Ignatova, G. S. Svidelskaya, E. A. Ponomarenko, S. P. Gambaryan, A. N. Sveshnikova, and M. A. Panteleev 1489

The Involvement of the ERBB2/HER2 Tyrosine Kinase Receptor in the Regulation of Cell Death (Review)
A. A. Daks, O. A. Fedorova, O. Y. Shuvalov, S. E. Parfenev, and N. A. Barlev 1500

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1323 – 1330

УДК 577.24

ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК: ИСТОРИЧЕСКИЕ ЗАМЕТКИ ИЗ РОССИИ

Мини-обзор

© 2020 Б. Животовский[1,2]

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия*

[2] *Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция; электронная почта: boris.zhivotovsky@ki.se*

Поступила в редакцию 12.07.2020
После доработки 12.07.2020
Принята к публикации 16.07.2020

Исследование механизмов гибели клеток – одна из наиболее быстро развивающихся областей современной биомедицины. Особый интерес к этой проблеме возник в 1972 г. после опубликования статьи Kerr, Wyllie и Currie, в которой апоптоз, один из типов гибели клеток, впервые был рассмотрен как базовый биологический феномен, регулирующий гомеостаз тканей. Несколько российских групп, занимавшихся изучением механизмов индуцируемой радиацией гибели клеток, обратили внимание на схожесть между этими двумя механизмами. По некоторым объективным причинам эти работы долгое время не были доступны мировой общественности. В настоящем введении предпринята попытка восстановить цепь событий минувших дней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, радиация, митохондрии, нуклеазы, протеазы.

DOI: 10.31857/S0320972520100012

К.П. Хансон (1936–2005)

Моему учителю посвящается!

То, что верно для бактерий, верно и для слона.
Жак Моно

ВВЕДЕНИЕ

У этих исторических заметок две цели. Первая – никогда непроходящая память и благодарность моему Учителю и другу профессору Кайдо Хансону. Он учил тому, как надо относиться к научному исследованию, как не надо бояться сложностей и как надо критически смотреть на

результаты. Мне трудно судить о том, полностью ли я выполнял его наставления, но абсолютно честно скажу, что очень старался. Вторая цель – рассказать молодому поколению исследователей историю развития такого важного медико-биологического направления, как программируемая гибель клеток, и о роли российских исследователей в его разработке. Дело в том, что не только до, но и сразу после появления в 1972 г. принципиально важной для данной области знаний статьи Kerr, Wyllie и Currie [1], несколько российских групп стали очень серьезно заниматься изучением механизмов индуцируемой радиацией гибели клеток. Основная часть полученных в этих исследованиях результатов была опубликована на русском языке и, по известным причинам, долгое время они не были доступны мировой общественности. Впоследствии некоторые из них были переведены, опубликованы в международных журналах и признаны зарубежными коллегами. Так, в статье, написанной одним из пионеров исследования апоптоза A. Wyllie, среди ведущих мировых лабораторий, работающих в области апоптоза, была отмечена наша лаборатория радиобиологии в Ленинграде [2]. Сейчас, почти 50 лет спустя, очень хочется восстановить цепь событий минувших дней. Итак...

КАК ЭТО БЫЛО?

Известно, что все биологические организмы, как одноклеточные, так и многоклеточные, смертны. К сожалению, вскоре после создания Шлейденом и Шванном теории клетки и обнаружения феномена ее деления и дифференцировки [3, 4] многие исследователи сфокусировали свое внимание на изучении механизмов клеточной пролиферации и изменению ее фенотипа и практически полностью игнорировали интерес к выяснению того, как клетка элиминируется. Cart Vogt был первым, кто описал процесс гибели клеток в хорде и прилегающем хряще у метаморфических жаб [5]. Однако это был пример единичного исследования. Вскоре стало понятно, что в процессе развития и в течение жизни большое количество клеток, как у позвоночных, так и беспозвоночных, погибает. Более того, в некоторых случаях таким образом удаляются целые ткани или органы, выполнившие свои функции. Предпринимались редкие попытки классифицировать различные виды клеточной гибели. Так, еще в 1951 г. Glucksmann предложил в соответствии с биологическим назначением подразделять «естественную» клеточную гибель на морфогенетическую, гистогенетическую и филогенетическую [6]. Saunders первым пришел к мысли о том, что гибель клеток в эмбриогенезе и морфогенезе может происходить в результате активации генетической программы, запускаемой особыми как внутритканевыми, так и внешними сигналами [7]. Однако первым, кто экспериментально подтвердил генетическую детерминированность гибели клеток и то, что этот процесс может быть не случайным, а регулируемым, был Richard Lockshin. На примере дегенерации межсегментальных мышц шелкопряда им было установлено наличие процесса «программируемой гибели клеток» и введен в практику этот термин [8]. В 1972 г. Kerr, Wyllie и Currie [1] опубликовали статью, которая привлекла пристальное внимание многих исследователей к данной проблеме. Авторы предложили рассматривать апоптоз, генетически запрограммированный тип гибели, как важное биологическое явление, регулирующее гомеостаз тканей. Как сказано выше, задолго до появления этой важной публикации и, соответственно, резко возросшему интересу к данному вопросу, в литературе имелись отдельные статьи на эту тему. Так, еще в 1950-е гг. особенное внимание уделялось изучению радиационно-индуцируемой гибели клеток. В радиобиологии было принято различать два типа клеточной гибели: репродуктивный и интерфазный. Первый – связывали с митотическим циклом и потерей клетки способности к делению. Второй, наоборот, происходил до вступления клетки в митоз и не связывался с циклом деления. Поэтому его называли «немитотической», «немедленной», «интерфазной» или «гибелью в отсутствии деления». Okada разделял три типа интерфазной гибели: 1) гибель некоторых видов неделящихся или ограниченно делящихся клеток (лимфоциты, тимоциты, энтероциты, клетки ростовой зоны хрусталика и т.д.) в первые часы после облучения в дозах от сотых долей до нескольких Грей; 2) гибель делящихся клеток в культуре при воздействии высоких доз излучения (десятки Грей); 3) гибель неделящихся или редко делящихся клеток (нервные и мышечные клетки, гепатоциты, кардиоциты и др.) при облучении сверхвысокими дозами (десятки и сотни Грей) [9]. В России эту проблему исследовали особенно детально. Так, в 1970-е гг. Хансон сформулировал гипотезу, согласно которой феномен радиационно-индуцируемой интерфазной гибели лимфоидных клеток впервые рассматривался как пример программируемой гибели клеток, апоптоза [10]. Данная гипотеза базировалась на собственных и накопленных в литературе экспериментальных данных и привела к дополнительному всплеску исследований этого феномена. Хансон рассмат-

ривал радиационную интерфазную гибель под принципиально новым углом зрения. Дело в том, что ионизирующее излучение не является единственным агентом, обладающим лимфолитическим действием. Аналогичные морфологические и молекулярные события разыгрываются в лимфоцитах в ответ на воздействия стероидных гормонов, алкилирующих агентов и некоторых других химических соединений. В пользу выдвинутой гипотезы свидетельствовали многие экспериментальные данные. Во-первых, было установлено, что независимо от характера начального воздействия, вызвавшего повреждение, реализуется единый механизм распада хроматина и наблюдается единая морфологическая картина гибели лимфоидных клеток. Во-вторых, было обнаружено существенное сходство молекулярных событий, происходящих при интерфазной гибели лимфоидных клеток и в процессе развертывания генетической программы дифференцировки, завершающейся, например, элиминацией клеточного ядра. В-третьих, было установлено, что ультрафиолетовое и гамма-излучения в дозах, вызывающих интерфазную гибель, способны включать программу эритродифференцировки лейкемических клеток. В-четвертых, было известно, что в процессе иммунодифференцировки и при стрессовых воздействиях определенная популяция лимфоцитов (клетки коркового слоя тимуса) погибает, выполняя свои физиологические функции в организме. Последнее рассматривалось как пример программируемой гибели клеток. Важно отметить, что эта гипотеза была впоследствии подвергнута очень детальной проверке многими лабораториями и признана научным сообществом [11, 12].

Исследования в области программируемой гибели клеток включают несколько периодов. Так, сначала была описана цитологическая картина физиологической гибели. Наиболее ранним морфологическим признаком в клетке была признана конденсация ядерного материала. Эти изменения детально описаны в статье Kerr et al. как характерные для апоптоза [1]. Накопленные результаты позволили предположить, что в основе гибели клеток лежат события, происходящие в ядре. Начался т.н. «ядерный период» в исследовании этого клеточного феномена. Действительно, в 1980 г. Wyllie опубликовал статью в «Nature», в которой показал, что описанная ранее типичная для апоптоза конденсация хроматина в обработанных глюкокортикоидами тимоцитах и опухолевых лимфоидных клетках тесно связана с межнуклеосомной фрагментацией хроматина и удалением нуклеосомных цепей, по-видимому, посредством активации внутриклеточной, но не лизосомальной эндонуклеазы [13]. Следует подчеркнуть, что задолго до появления этой статьи была опубликована работа, описывающая *in vivo* деградацию хроматина облученных лимфоидных клеток с образованием регулярных фрагментов [14]. Эти данные были подтверждены несколькими научными группами [15, 16], и наличие межнуклеосомной фрагментации хроматина было признано одним из отличительных признаков апоптоза. Справедливости ради необходимо также отметить, что, используя достаточно простые биохимические методы еще до введения в научную литературу термина «апоптоз», было показано, что в результате воздействия гамма-облучения, гидрокортизона и дегранола в щитовидной железе крыс появляются низкомолекулярные продукты распада дезоксирибонуклеопротеинов [17], и определен белковый состав этих фрагментов эндонуклеолиза хроматина [18]. Впоследствии было установлено, что это и есть продукты межнуклеосомной деградации хроматина.

Дальнейшие эксперименты *in vitro* показали, что процесс распада хроматина требует участия нуклеазы, зависящей от наличия ионов кальция и магния. Многие лаборатории включились в ее активный поиск и установление механизмов ее активации [19]. В это же время появились первые данные о возможном участии протеаз в регуляции апоптоза. Так, было показано, что гомолог IL1β-converting enzyme, белок Ced-3, необходим для активации программируемой гибели клеток нематоды *C. elegans* [20]. Впоследствии оказалось, что IL1β-converting enzyme представляет собой один из белков большого семейства, названного каспазами [21]. Интересно отметить, что в это же время появилась работа Филипповича с сотр., в которой впервые было установлено, что ингибиторы протеаз способны существенно замедлить деградацию ядерной ДНК в тимоцитах, подвергнутых облучению либо действию дексаметазона [22]. Важно, что ни гистоны, ни белки ядерного матрикса тимоцитов не подвергались протеолизу после таких воздействий. Более того, впервые было показано, что деградация хроматина в этих условиях не была обусловлена активацией Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы. Впоследствии работы из лабораторий Nagata и Wang продемонстрировали, что распад генетического материала действительно не связан с Ca/Mg-зависимой эндонуклеазой, но зависит от протеолитического расщепления каспазой-3 ингибитора эндонуклеазы (ICAD/DFF45), приводившего к активации каспазо-зависимой эндонуклеазы (CAD/DFF40) [23–26]. Впоследствии, в работах Nagata и Horvitz, было обнаружено, что ДНК апоптоти-

ческих клеток как человека, так и нематоды *C. elegans* может быть разрушена не только клеточно-автономно в умирающих клетках с помощью CAD/DFF40, но также с помощью ДНКазы II в лизосомах фагоцитов после поглощения апоптотических клеток [27, 28].

С накоплением данных об участии цитоплазматических протеаз в апоптозе сформировалось мнение, что главными в развитии апоптотической гибели являются цитоплазматические события, т.е. фокус исследований сместился с «ядра в цитоплазму». Действительно, участие каспаз в активации двух основных путей апоптоза, рецепторного и митохондриального, подтверждало данное предположение. Особенно это подтвердилось при выявлении белков-мишеней каспаз. Так, впервые Lazebnik et al., установили, что активная цитоплазматическая протеаза (позднее было показано, что это каспаза-3) способна расщеплять ядерный белок PARP, нарушая репарацию поврежденной ДНК и приводя к ее деградации [29]. Возвращаясь в историю, следует подчеркнуть, что задолго до обнаружения PARP как первого субстрата каспаз, Уманский с сотр. наблюдали снижение поли(ADP-рибоза) полимеразной активности через 2–3 час после облучения тимоцитов [30]. Более того, это снижение по времени совпадало с активацией межнуклеосомной деградации хроматина в облученных клетках [31]. Одновременно Филиппович с сотр. установили, что NAD-поли(ADP-рибоза)полимеразная система, не является пусковым механизмом в радиационно-индуцированной гибели тимоцитов, но регулирует радиационный ответ этих клеток на повреждение [32, 33]. Интересно, что этот эффект наиболее четко воспроизводился в радиочувствительных, нежели в радиоустойчивых тканях. Как отмечено выше, на «лидирующую» роль цитоплазмы в апоптозе указывал также факт расщепления каспазой-3 ингибитора каспазо-зависимой эндонуклеазы, что приводило к ее активации в ядре [23–26].

В середине 1990-х гг., благодаря серии работ X. Wang, было высказано предположение о том, что важные события в развитии апоптоза связаны с митохондриями [34, 35]. Прежде всего было показано, что, находясь в цитоплазме, митохондриальный белок, цитохром *c*, способствует сборке комплекса апоптосомы, что ведет к последовательной активации каспазы-9 и каспазы-3 [36]. Начался «митохондриальный период» в исследовании апоптоза. Услышав доклад Wang на Гордоновской конференции и прочитав его статью в журнале «Cell», я вспомнил давние радиобиологические исследования в которых было показано значение цитохрома *c* в развитии радиационной гибели клеток. Как отмечено выше, намного раньше «эпохи» апоптоза гибель клеток достаточно интенсивно изучалась в радиационной биологии, поскольку именно гибель клетки является конечным результатом воздействия ионизирующего излучения. Исследования изменений в биоэнергетике клетки, вызванных радиацией, были одной из наиболее активно развивающихся областей радиобиологии в 1950-х и 1960-х гг. [37–40]. Изучение механизмов ранней массовой гибели клеток в радиочувствительных тканях в 1950-х гг. выявило подавление окислительного фосфорилирования в митохондриях тимуса и селезенки [38]. В одной из ранних работ мой учитель К. Хансон показал, что данное явление не наблюдалось в митохондриях, выделенных из радиорезистентных тканей [41]. Подавление окислительного фосфорилирования обнаруживалось через 30–60 мин после общего рентгеновского облучения крыс в относительно низких дозах облучения (50–100 сГр) [41, 42]. В радиочувствительных тканях подавление окислительного фосфорилирования сопровождалось образованием пикнотических ядер (апоптотических телец) [42]. Было установлено, что в митохондриях тимуса наблюдается замедление переноса электронов между цитохромами *b* и *c*, что можно объяснить снижением содержания цитохрома *c* после облучения [39]. В качестве одной из причин называлось ослабление связывания цитохрома *c* с внутренней мембраной митохондрий [43]. Интересно, что добавление экзогенного цитохрома *c* стимулировало скорость потребления кислорода митохондриями, выделенными из радиочувствительных, но не из радиорезистентных тканей облученных крыс [44, 45]. Потеря цитохрома *c* не была результатом его пассивного выхода из митохондрий, поскольку дополнительное промывание митохондриальной фракции изотоническим буфером не вызывало дальнейшего снижения скорости дыхания митохондрий [44]. Интересно, что облучение изолированных митохондрий *in vitro* не влияло на содержание цитохрома *c* [44]. Таким образом, было высказано предположение, что нарушение переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий радиочувствительных тканей обусловлено регулируемым высвобождением цитохрома *c* из митохондрий и его появлением в цитозоле [40, 44]. Интересно отметить, что выход цитохрома *c* был заметно меньше, когда он находился в полностью восстановленном состоянии, а не частично окислен или подвержен альтернативным изменениям окисления-восстановления. В поддержку этих более ранних наблюдений спустя почти 30 лет появились исследования о механизмах высвобождения цитохро-

ма *c* из митохондрий в клетках, подвергшихся облучению [46], и о важности окислительно-восстановительного состояния цитохрома *c* в процессе активации каспазы в цитозольных экстрактах [47]. Впоследствии многие из этих данных были подтверждены с использованием более точных методов исследования. Так, было установлено что появление цитохрома *c* в цитозоле представляет собой двухступенчатый процесс. Поскольку цитохром *c* находится на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий в комплексе с кардиолипином, это взаимодействие должно быть сначала разрушено для создания растворимого пула гемопротеина. Было установлено, что солюбилизация цитохрома *c* включает нарушение электростатических и/или гидрофобных связей, которые этот белок обычно поддерживает с кардиолипином [48]. Этому нарушению способствует селективное перекисное окисление кардиолипина [49]. Как только цитохром *c* солюбилизирован, пермеабилизация наружной митохондриальной мембраны с помощью Bax/Bak достаточна, чтобы позволить экструзию этого белка в экстрамитохондриальную среду [50]. Было объяснено, каким образом добавление экзогенного цитохрома *c* способно восстановить работу цепи переноса электронов [51]. Наконец, с помощью инвазивного подхода было показано, что микроинъекция цитохрома *c* во все исследованные типы клеток индуцировала в них апоптоз [52].

Интересно, что облучение вызывало лишь умеренное снижение уровня АТФ в клетках тимуса, селезенки и некоторых раковых клетках [45]. Это наблюдение показало, что потеря цитохрома *c* митохондриями не была существенной, чтобы заметно влиять на выработку АТФ митохондриями, или что эту потерю нельзя было компенсировать с помощью гликолиза. Значительно позже появились исследования, подтвердившие идею, что высвобождение цитохрома *c* совместно с поддержанием жизненно необходимого внутриклеточного пула АТФ необходимы для реализации программы апоптоза [53, 54]. В работах Reed [55] и Schendel [56] обсуждались два возможных пути апоптоза, в которых принимает участие высвобождаемый из митохондрий цитохром *c*. Один из них включает активацию каскада каспаз путем взаимодействия высвобожденного гемопротеина с Apaf-1 и прокаспазой-9 в цитозоле [36], тогда как другой связан с замедлением транспорта митохондриальных электронов, что ведет не только к нарушению продукции АТФ, но и генерации активных форм кислорода. Этот второй путь очень похож на тот, который описал Scaife много лет назад [45].

Дальнейшие исследования показали, что протекание не только апоптоза, но и других типов гибели не является работой лишь одного из внутриклеточных компартментов, а включает их тесное взаимодействие.

Важно отметить, что многие из полученных радиобиологами данных впоследствии были использованы и подтверждены при исследовании радиационного поражения в результате Чернобыльской аварии, особенно у людей, занятых очисткой территории. Так, в качестве одного из подходов биологической дозиметрии был использован анализ распада хроматина в клетках крови. В определенных диапазонах доз была получена прямая зависимость между дозой облучения и уровнем накопления фрагментов деградации хроматина.

К сожалению, многие из российских лабораторий, занимающихся проблемой гибели клеток, в силу различных обстоятельств прекратили свои исследования. Однако появились новые группы, которые рассматривали гибель клеток с более широких позиций. Так, В.П. Скулачев для описания программируемой гибели организма по аналогии с феноменом гибели клеток, апоптозом, предложил использовать термин «феноптоз» [57]. В отличие от случая «острого» феноптоза, примером которого автор рассматривал смерть горбуши сразу после окончания нереста, примером «мягкого», растянутого во времени феноптоза было предложено рассматривать процесс старения. Было постулировано, что программа старения закодирована в геноме в виде цепи летальных биохимических событий, инициированных в митохондриях активными формами кислорода (мАФК). Если так, то ингибитором этой программы мог бы служить антиоксидант, специфически направляемый в митохондрии. Эта интересная идея В.П. Скулачева нашла подтверждение во многих работах [58, 59]. Молекулярные механизмы таких видов программируемой гибели клеток, как апоптоз, некроптоз, аутофагия, ферроптоз и др., во многом расшифрованы. Недавно была предпринята попытка выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе феноптоза. Было установлено, что «умеренная» деполяризация внутренней мембраны митохондрий достаточна для полного ингибирования накопления мАФК, что является одним из важнейших компонентов регуляции старения и феноптоза [60]. Детальная расшифровка молекулярных механизмов феноптоза требует дополнительных исследований.

В последние 10 лет в России наблюдается ренессанс в изучении как фундаментальных аспектов программируемой гибели клеток, так и ее роли в патогенезе различных заболеваний,

прежде всего онкологических. Этому способствовало создание, благодаря Мегагранту Российского правительства, лаборатории на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова (Животовский Б.), активной работе лабораторий на биологическом факультете (Онищенко Г. Е., Скулачев В.П.), на физическом факультете (Пантелеев М.А.), лаборатории в Институте цитологии и генетики в Новосибирске (Лаврик И.Н.), лаборатории в Институте цитологии (Барлев Н.А., Piacentini M.) и Технологическом университете (Melino G.) в Санкт-Петербурге. Немаловажное значение имело создание новых зондов для исследования гибели клеток в лабораториях С.А. и К.А. Лукьяновых. Есть надежда, что такая тенденция будет продолжена, и российские исследователи вновь внесут свой вклад в развитие одной из ключевых медико-биологических проблем.

Важность того, что большое количество клеток в различных тканях самоуничтожается при нормальном развитии и при многочисленных патологиях не вызывает сомнений. Данный номер журнала «Биохимия», выходящий к 10-летию создания Лаборатории исследования механизмов апоптоза в МГУ им. М.В. Ломоносова, посвящен обсуждению этого феномена с различных позиций. В этот выпуск вошли статьи и обзоры как молодых сотрудников Лаборатории, так и коллег из вышеперечисленных лабораторий и исследовательских центров. Очень надеюсь, что этот выпуск заинтересует читателей журнала «Биохимия», а также широкий круг исследователей в данной области знаний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (19-15-00125). Работа лабораторий также поддерживается грантами РФФИ (18-29-09005), Шведского (190345) и Стокгольмского (181301) противораковых фондов.

Конфликт интересов. Автор заявляет 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

1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
2. Wyllie, A. H. (1988) Apoptosis, *ISI Atlas of Science: Immunology*, **1**, 192-196.
3. Schleiden, M. J. (1838) Beiträge zur phytogenesis, *Arch. Anat. Physiol. Wiss Med.*, 137-176.
4. Schwann, T. (1839) Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen, Sander, Berlin.
5. Vogt, C. (1842) Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans), Solothurn: Jent und Gassmann.
6. Glücksmann, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **26**, 59-86, doi: 10.1111/j.1469-185x.1951.tb00774.x.
7. Saunders, J. W. (1966) Death in embryonic systems, *Science*, **154**, 604-612, doi: 10.1126/science.154.3749.604.
8. Lockshin, R. A., and Williams, C. M. (1965) Programmed cell death: cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth, *J. Insect. Physiol.*, **11**, 123-133, doi: 10.1016/0022-1910(65)90099-5.
9. Okada, S. (1970) Radiation biochemistry (Altman, K. L., Gerber, G. B., and Okada, Sh., eds.) Vol. 2, Tissue and Body Fluids, Academic Press, New York, London, pp. 247-307.
10. Hanson, K. P. (1979) Radiation-induced cell death, *Radiobiology*, **19**, 814-820 (in Russian).
11. Umansky, S. R. (1982) Genetic program of cell death: hypothesis and some applications, *Ach. Modern Biol.*, **93**, 139-148 (in Russian).
12. Yamada, T., and Ohyama, H. (1988) Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis), *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **53**, 65-75, doi: 10.1080/09553008814550431.
13. Wyllie, A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, **284**, 555-556, doi: 10.1038/284555a0.
14. Cole, L. J., and Ellis, M. E. (1957) Radiation-induced changes in tissue nucleic acids; release of soluble deoxypolynucleotides in the spleen, *Radiat. Res.*, **7**, 508-517, PMID: 13485392.
15. Ermolaeva, N. V., and Vodolazskaya, N. A. (1970) Separation on phosphate cellulose of deoxyribonucleoproteins formed after irradiation and *in vitro* treatment with enzymes, *Biochemistry*, **35**, 641-647.
16. Skalka, M., Matyásová, J., and Cejková, M. (1975) DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades *in vivo* into regular fragments, *FEBS Lett.*, **72**, 271-274, doi: 10.1016/0014-5793(76)80984-2.
17. Vodolazskaya, N. A., and Ermolaeva, N. V. (1974) Comparative analysis of the state of DNA and histone fraction in DNP and salt extracts of rat thymus after gamma radiation, as well as the introduction of degranol and hydrocortisone, *Radiobiology*, **14**, 651-655.
18. Vodolazskaya, N. A., and Ermolaeva, N. V. (1971) Study of the decay products of deoxyribonucleoproteins induced by gamma irradiation, hydrocortisone and degranol in the thyroid gland of rats by the methods of separation into phosphate cellulose and viscometry, *Radiobiology*, **11**, 335-358.
19. Zhivotovsky, B., Wade, D., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1994) Role of nucleases in apoptosis, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **105**, 333-338, doi: 10.1159/000236778.
20. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell*, **75**, 641-652, doi: 10.1016/0092-8674(93)90485-9.
21. Zhivotovsky, B., Burgess, D. H., Vanags, D. M., and Orrenius, S. (1997) Involvement of cellular proteolytic

machinery in apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 481-488, doi: 10.1006/bbrc.1996.6016.
22. Soldatenko, V. A., Denisenko, M. F., Alferova, T. M., and Filippovich, I. V. (1991) Chromatin degradation during the death of thymic lymphocytes under the influence of radiation or dexamethasone: the need for a preliminary proteolysis stage, *Radiobiology*, **31**, 180-187.
23. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, **391**, 43-50, doi: 10.1038/34112.
24. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Natur*e, **391**, 96-99, doi: 10.1038/34214.
25. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell*, **89**, 175-184, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80197-x.
26. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., and Wang, X. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8461-8466, doi: 10.1073/pnas.95.15.8461.
27. Wu, Y. C., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (2000) NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis, *Genes Dev.*, **14**, 536-548, PMID: 10716942.
28. Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2001) Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver, *Science*, **292**, 1546-1549, doi: 10.1126/science.292.5521.1546.
29. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature*, **371**, 346-347, doi: 10.1038/371346a0.
30. Zotova, R. N., Umansky, S. R., and Tokarskaya, V. I. (1983) Mechanism of chromatin degradation in thymocytes of irradiated rats. Part 6. Post-radiation changes in the activity of poly (ADP/ribose)-polymerase, *Radiobiology*, **23**, 152-156.
31. Nelipovich, P. A., Nikonova, L. V., and Umansky, S. R. (1988) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca^{2+}/Mg^{2+}-dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **53**, 749-765, doi: 10.1080/09553008814551111.
32. Denisenko, M. F., Belovskaya, L. N., Soldatenkov, V. A., Smirnova, T. N., and Filippovich, I. V. (1987) Poly(ADP-ribosylation) of proteins determines the pool of endogenous NAD and the radiosensitivity of thymic lymphocytes, *Radiobiology*, **27**, 737-742.
33. Denisenko, M. F., Soldatenkov, V. A., Belovskaya, L. N., and Filippovich, I. V. (1989) Is the NAD-poly (ADP-ribose) polymerase system the trigger in radiation-induced death of mouse thymocytes? *Int. J. Radiat. Biol.*, **56**, 277-285, doi: 10.1080/09553008914551441.
34. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*, *Cell*, **86**, 147-157, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80085-9.
35. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997) Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, **91**, 479-489, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
36. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome *c*-dependent activation of caspase-3, *Cell*, **90**, 405-413, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80501-2.
37. Ashwell, G., and Hickman, J., (1952) Effects of X-irradiation upon the enzyme systems of the mouse spleen, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **80**, 407-413, doi: 10.3181/00379727-80-19639.
38. Van Bekkum, D. W. (1957) The effect of X-rays on phosphorylation *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 487-492, doi: 10.1016/0006-3002(57)90518-8.
39. Scaife, J. F. (1964) The nature of the radiation-induced lesion of the electron transport chain of thymus mitochondria, *Can. J. Biochem.*, **42**, 431-434, doi: 10.1139/o64-050.
40. Manoilov, S. E. (1968) *Primary Mechanisms of the Biological Action of Ionizing Radiation*, Medicine, Leningrad.
41. Hanson, K. P., and Mytareva, L. V. (1967) Mechanisms of the effect of ionizing radiation on oxidative phosphorylation in animals, *Proc. Acad. Sci. (Estonia)*, **16**, 80-87.
42. Van Bekkum, D. W., DeVries, M. J., and Klowen, H. M. (1964) Biochemical and morphological changes in lymphatic tissues following partial-body irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **8**, 395-401.
43. Scaife, J. F., and Hill, B. (1963) Uncoupling of oxidative phosphorylation by ionizing radiation. II. The stability of mitochondrial lipids and cytochrome *c*, *Can. J. Biochem.*, **41**, 1223-1227, PMID: 13976477.
44. Manoilov, S. E., and Hanson, K. P. (1964) The effect of exogenous cytochrome *c* on oxidative phosphorylation in mitochondria of tissues isolated from irradiated animals, *Vopr. Med. Chem.*, **10**, 410-416.
45. Scaife, J. F. (1966) The effect of lethal doses of X-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome *c*, *Can. J. Biochem.*, **44,** 433-439, PMID: 4289628.
46. Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z. M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., and Kufe, D. (1997) Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome *c* accumulation in DNA damage-induced apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6939-6942, doi: 10.1073/pnas.94.13.6939.
47. Hampton, M. B., Zhivotovsky, B., Slater, A. F. G., Burgess, D. H., and Orrenius, S. (1998) Importance of the redox state of cytochrome *c* during caspase activation in cytosolic extracts, *Biochem. J.*, **329**, 95-99, doi: 10.1042/bj3290095.
48. Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002) Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1259-1263, doi: 10.1073/pnas.241655498.
49. Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, I. I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V., and Borisenko, G. G. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 223-232, doi: 10.1038/nchembio727.
50. Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2005) Cardiolipin oxidation sets cytochrome *c* free, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 188-189, doi: 10.1038/nchembio0905-188.
51. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol. Cell*, **17**, 525-535, doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.003.
52. Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O. T., and Doskeland, S. O. (1998) Injected cytochrome *c* induces apoptosis, *Nature*, **391**, 449-450, doi: 10.1038/35060.

53. Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis, *Cancer Res.*, **57**, 1835-1840, PMID: 10232605.
54. Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., and Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis, *J. Exp. Med.*, **185**, 1481-1486, doi: 10.1084/jem.185.8.1481.
55. Reed, J. (1997) Cytochrome *c*: can't live with it – can't live without it, *Cell*, **91**, 559-562, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80442-0.
56. Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels, *Cell Death Differ.*, **5**, 372-380, doi: 10.1038/sj.cdd.4400365.
57. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1394-1399, PMID: 9467841.
58. Libertini, G. (2012) Classification of phenoptotic phenomena, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 707-715, doi: 10.1134/S0006297912070024.
59. Walker, R. F. (2017) On the causes and mechanisms of phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1820-1841, doi: 10.1134/S0006297917120069.
60. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.

PROGRAMMED CELL DEATH: HISTORICAL NOTES FROM RUSSIA

Mini-review

B. Zhivotovsky[1,2]

[1] *Faculty of Basic Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

[2] *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; E-mail: boris.zhivotovsky@ki.se*

Received July 12, 2020
Revised July 12, 2020
Accepted July 16, 2020

The investigation of cell death mechanisms is one of the fastest growing areas of modern biomedicine. A particular interest in this research topic arose in 1972 after publication of an article by Kerr, Wyllie, and Currie, in which apoptosis, one of the types of cell death, was first considered as a basic biological phenomenon regulating tissue homeostasis. Several Russian groups involved in the investigation of the mechanisms of radiation-induced cell death have drawn attention to the similarity between these two mechanisms. Unfortunately, these studies have been for a long time inaccessible to the international scientific community. These introductory remarks attempt to restore the chain of events that have taken place during the past 50 years

Keywords: apoptosis, radiation, mitochondria, nucleases, proteases

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1331 – 1343

УДК 577.24

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕМОНСТРИРУЕТ ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ФИЛАМЕНТОВ DED НА АКТИВНОСТЬ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ, НАЦЕЛЕННЫХ НА ГЕТЕРОДИМЕР КАСПАЗА-8/c-FLIP$_L$

© 2020 Н.В. Иванисенко[1], И.Н. Лаврик[1,2]*

[1] *Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: n.ivanisenko@gmail.com*

[2] *Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg, 39106 Magdeburg, Germany; E-mail: ilav3103@gmail.com*

Поступила в редакцию 17.07.2020
После доработки 24.07.2020
Принята к публикации 24.07.2020

Активация прокаспазы-8 в «сигнальном комплексе, индуцирующем гибель» клетки (DISC), приводит к запуску внешнего пути апоптоза. Активация прокаспазы-8 происходит в филаментах «эффекторного домена смерти» (DED), и этот процесс регулируется белками c-FLIP, в частности, т.н. длинной изоформой белка, c-FLIP$_L$. Недавно было описано первое рационально сконструированное химическое соединение, FLIPin, нацеленное на гетеродимер каспаза-8/c-FLIP$_L$. FLIPin повышает активность каспазы-8 при процессинге гетеродимера. В настоящей работе с использованием кинетической модели были исследованы механизмы действия FLIPin в комплексе DISC. Ключевой целью данной работы было предсказание активности FLIPin в зависимости от различной стехиометрии и состава DED филамента. С помощью математического моделирования были получены оптимальные соотношения между белком c-FLIP$_L$ и прокаспазой-8 в различных внутриклеточных ландшафтах, благоприятствующих действию FLIPin. Анализ модели показал, что в модуляции активности FLIPin при снижении или повышении экспрессии c-FLIP$_L$ задействованы различные молекулярные механизмы. Таким образом, комбинация математического моделирования и системной фармакологии является важным инструментом для разработки более эффективных терапевтических подходов и предсказания оптимальных стратегий лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, DISC, каспаза-8, FLIPin, DED, DRs.

DOI: 10.31857/S0320972520100024

ВВЕДЕНИЕ

Инициация внешнего пути апоптоза происходит в результате активации т.н. рецепторов смерти (DRs), в частности, CD95/Fas/APO-1 или TRAIL-R1/2 [1]. Это приводит к формированию макромолекулярной платформы, обозначаемой как «сигнальный комплекс, индуцирующий гибель» (DISC) [2, 3]. В состав DISC входят соответствующий рецептор смерти (DR), белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора (FADD), белки прокаспаза-8, прокаспаза-10 и c-FLIP. Сборка DISC приводит к активации прокаспазы-8, что происходит в составе филаментов, образуемых эффекторными доменами смерти (DED). Сборка DED филаментов происходит за счет взаимодействия между эффекторными доменами смерти и белков FADD, прокаспазы-8, прокаспазы-10 и белка c-FLIP. Образованные филаменты DED служат в качестве платформы для димеризации и последующей активации прокаспазы-8 [4–7].

Димеризация каталитических доменов прокаспазы-8a/b приводит к конформационным изменениям структуры прокаспазы-8a/b и положения т.н. петли L2, которая играет центральную роль в структурной организации активного центра данного фермента [8, 9]. Это событие приводит к формированию активного центра каспазы-8 и далее к инициации активации прокаспазы-8. Следует отметить, что вслед за активацией прокаспазы-8 происходит её автокаталитический процессинг, который включает расщепление петли L2 в районе остатка аспарагиновой кислоты D374 на фрагменты L2 («процессированный» L2) и L2′. Данное событие приводит к образованию продуктов расщепления прокаспазы-8a/b (p43/p41 и p12) [10]. Последние далее подвергаются автокаталитическому процессингу в результате протеолиза по аминокислотным ос-

Принятые сокращения: DISC (death-inducing signaling complex) – сигнальный комплекс, индуцирующий гибель клетки; DED (death effector domain) – эффекторный домен смерти; FLIPin (FLIP inhibitor) – ингибитор белка FLIP; DRs (death receptors) – рецепторы смерти.

* Адресат для корреспонденции.

таткам D384 и D210/216 с образованием т.н. активных субъединиц каспазы-8 (p10 и p18), которые, в свою очередь, образуют гетеротетрамер $p10_2/p18_2$ [11–14]. Показано, что гомодимер прокаспаза-8a/b и продукт его расщепления p43/p41 обладают каталитической активностью, которая тесным образом связана с конформационными изменениями в активном центре после димеризации прокаспазы-8 [7, 11]. Кроме того, было показано, что активность прокаспазы-8 отличается от активности гетеротетрамера каспазы-8 ($p10_2/p18_2$), и оба комплекса характеризуются различной субстратной специфичностью [7, 11].

Описаны три изоформы белка c-FLIP, обозначаемые Long (L), Short (S) и Raji (R), т.е. c-$FLIP_L$, c-$FLIP_S$ и c-$FLIP_R$ [15, 16]. Короткие изоформы белка c-FLIP, а именно, c-$FLIP_S$ и c-$FLIP_R$ блокируют активацию прокаспазы-8 в филаментах DED. В то же время c-$FLIP_L$ в составе DISC может действовать и как активатор апоптоза, и как его ингибитор [8, 9, 17– 19]. С позиции структурной биологии, проапоптотическая функция c-$FLIP_L$ опосредована образованием гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$, в которых петля L2 прокаспазы-8 и, тем самым, ее активный центр стабилизированы в «закрытой» конформации через взаимодействия с белком c-$FLIP_L$. Это приводит к повышению ферментативной активности каспазы-8 [8, 20, 21]. Было показано, что проапоптотическое действие c-$FLIP_L$ наблюдается в случае низкого или среднего уровня экспрессии данного белка, в то время как при повышенной экспрессии данная изоформа действует как ингибитор апоптоза [17]. Данные выводы основаны на многих работах, в которых было показано, что уровень экспрессии c-$FLIP_L$ играет важную роль в его про- или антиапоптотической функции. Кроме того, недавно было показано, что антиапоптотическую роль белка c-$FLIP_L$ можно объяснить его влиянием на состав и структуру филамента DED [18, 22]. В частности, было показано, что повышенная экспрессия c-FLIP останавливает рост филамента DED, что приводит к укорочению филаментов DED и ограничению активации каспазы-8. Таким образом, количество белка c-FLIP играет роль чекпойнта, контролирующего длину филамента DED и его структуру [18].

Ожидается, что после активации прокаспазы-8 и последующего расщепления прокаспазы-8 по остатку D374 в гетеродимере прокаспаза-8/c-$FLIP_L$, «закрытая» конформация петли L2′ в молекуле прокаспазы-8 нарушается, что вызывает ингибирование активности каспазы-8 в составе гетеродимера прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ [8, 23]. Недавно была описана малая молекула, названная FLIPin (FLIP inhibitor), которая была разработана для увеличения каталитической активности гетеродимера [23]. FLIPin был сконструирован таким образом, чтобы связываться с белком c-$FLIP_L$ на интерфейсе гетеродимера каспаза-8/c-$FLIP_L$. FLIPin имитирует стабилизирующий эффект петли L2′ в «закрытой» конформации (рис. 1). В частности, предположено, что FLIPin связывается с гетеродимером после процессинга прокаспазы-8 и образования p43/p41 и, тем самым, восстанавливает сеть взаимодействий, приводя к стабилизации активного центра каспазы-8. Данное соединение было получено в результате проведения виртуального

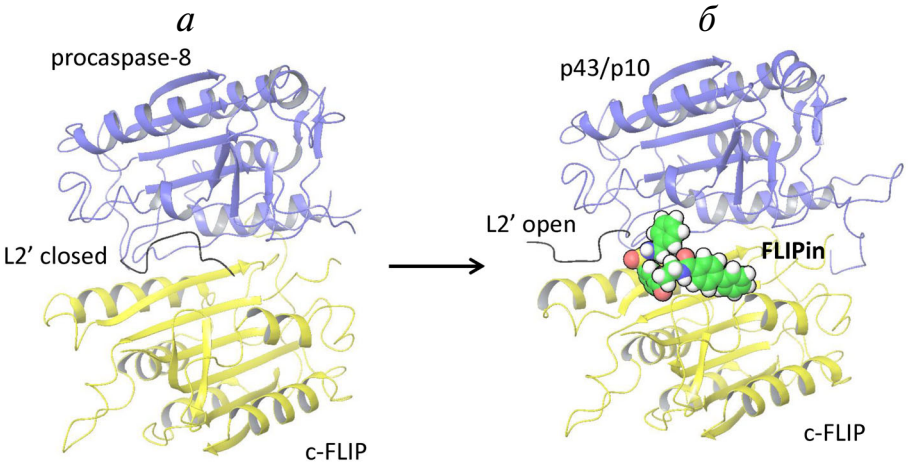


Рис. 1. Модель структуры гетеродимера каспаза-8/c-$FLIP_L$, связанного с FLIPin. *а* – Структура гетеродимера прокаспазы-8 (темно-синий цвет) и c-$FLIP_L$ (желтый цвет) [PDB ID 3H11]. Показана петля L2 в «закрытой» конформации; *б* – модель структуры гетеродимера белка c-$FLIP_L$ [PDB ID 3H11] и продукта протеолиза каспазы-8-p43/p10 [PDB ID 3H13], связанного с FLIPin (зеленый цвет) в предполагаемом связывающем центре. Показана петля L2′ в «открытой» конформации. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

скрининга *in silico*. Кроме того, на основе FLIPin было создано оптимизированное химическое соединение FLIPinBγ, которое повышает активность каспазы-8 в комплексе DISC, усиливает активацию эффекторных каспаз и DR-опосредованный апоптоз [23].

Математическое моделирование сети апоптоза стало мощным инструментом для изучения динамики регуляции гибели клеток [24, 25]. В частности, был очень тщательно изучен процесс CD95-опосредованной передачи сигнала с использованием системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ; ODEs), а также других математических формализмов, таких как булевые и агентные модели [5, 26–28]. С помощью математических моделей была получена новая информация о контроле механизмов внешнего пути апоптоза. В частности, было выявлено пороговое поведение CD95-опосредованной передачи сигнала и получено количественное представление о проапоптотической роли белков c-$FLIP_L$. Кроме того, были расшифрованы механизмы переключения про- и антиапоптотических сигнальных путей, индуцированных через рецептор CD95 [26, 29, 30].

Недавно нами была разработана математическая модель, которая позволяет проводить анализ влияния FLIPin на усиление активации прокаспазы-8 в комплексе DISC [23]. Однако данная модель не учитывала недавно открытую роль c-FLIP в регуляции состава и стехиометрии комплекса DISC [18]. Чтобы учесть новые структурные данные относительно роли c-$FLIP_L$ и получить количественные представления о механизмах действия FLIPin, в настоящей работе был использован метод математического моделирования с помощью системы ОДУ. На основе моделирования предсказаны оптимальные количественные соотношения между уровнями прокаспазы-8 и белка c-$FLIP_L$ в различных внутриклеточных ландшафтах для получения максимальной активности FLIPin. Полученные результаты обеспечивают основу для разработки новых, более эффективных терапевтических противораковых подходов, а также позволяют дополнить представления о механизмах регуляции филаментов DED.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование. Математическая модель была основана на системе ОДУ (ODEs), описывающих процессы активации каспазы-8 в комплексе DISC в присутствии или отсутствии FLIPinBγ. Данный подход был ранее представлен в работе [23] и доработан в данном исследовании. Значения скоростей реакции и параметры модели были взяты из работы [23]. Для решения ОДУ была использована программа Scipy.integrate.odeint из программного пакета Python SciPy (www.scipy.org). Модель была описана с помощью 12 дифференциальных уравнений (1–2, табл. 1) и 8 параметров (табл. 2).

Уравнения, использованные в модели:

$$\frac{dFLIP}{dt} = -\gamma \cdot k_d \cdot FLIP \cdot P8 + (1 - \sigma_{FLIPin}) \cdot k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 - k_{deg} \cdot FLIP \quad (1)$$

$$\frac{dP8}{dt} = -\gamma \cdot k_d \cdot FLIP \cdot P8 - 2 \cdot k_d \cdot P8 \cdot P8 - k_d \cdot P8 \cdot C8 - k_{deg} \cdot P8 \quad (2)$$

$$\frac{dC8}{dt} = (1 - \sigma_{FLIPin}) \cdot k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 \quad - 2 \cdot \gamma \cdot k_d \cdot C8 \cdot C8 - k_d \cdot P8 \cdot C8 - k_{deg} \cdot C8 \quad (3)$$

$$\frac{dFLIP_P8}{dt} = \gamma \cdot k_d \cdot FLIP \cdot P8 - k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 - k_{deg} \cdot FLIP_P8 \quad (4)$$

$$\frac{dP8_P8}{dt} = -k_p \cdot DISC_cat \cdot P8_P8 \; + k_d \cdot P8 \cdot P8 - k_{deg} \cdot P8_P8 \quad (5)$$

$$\frac{dC8_C8}{dt} = k_p \cdot DISC_cat \cdot (P8_P8 + P8_C8) \; + \gamma \cdot k_d \cdot C8 \cdot C8 \quad - k_{deg} \cdot C8_C8 \quad (6)$$

$$\frac{dP8_C8}{dt} = -k_p \cdot DISC_cat \cdot C8_P8 \; + k_d \cdot P8 \cdot C8 \quad - k_{deg} \cdot P8_C8 \quad (7)$$

$$\frac{dCellDeathSubstrate}{dt} = -k_{cd} \cdot CellDeathSubstrate \cdot DISC_cat - k_{cd_c3} \cdot CellDeathSubstrate \cdot C3 \quad (8)$$

$$\frac{dCellDeath}{dt} = -\frac{dCellDeathSubstrate}{dt} \quad (9)$$

$$\frac{dp3}{dt} = -k_{p3} \cdot DISC_cat \cdot p3 - k_{c3_p3} \cdot p3 \cdot c3 \quad (10)$$

$$\frac{dc3}{dt} = k_{p3} \cdot DISC_cat \cdot p3 + k_{c3_p3} \cdot p3 \cdot c3 \quad (11)$$

$$\frac{dFLIP_C8_FLIPin}{dt} = \sigma_{FLIPin} \cdot k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 \; - k_{deg} \cdot FLIP_C8_FLIPin \quad (12)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ODE модель процесса активации каспазы-8 в филаменте DED, описывающая влияние FLIPin. FLIPin нацелен на гетеродимер каспаза-8/c-$FLIP_L$, следовательно, количество гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$, образующихся на филаменте DED, должно прямо коррелировать с активностью FLIPin. Кроме того, недавно нами было показано, что белок c-$FLIP_L$ имеет два специфических сайта связывания в структуре филамента DED, и поэтому возможно как минимум две пространственные локализации, внутри которых может происходить сборка гетеродимера каспаза-8/c-$FLIP_L$ [18]. А именно c-$FLIP_L$ может связываться как с DED FADD, так и с доменом DED2 прокаспазы-8, что и обеспечивает образование гетеродимеров. Кроме того, данный факт приводит к возникновению ситуации, при которой белок c-$FLIP_L$ может ограничивать рост филаментов DED и при повышенной экспрессии укорачивать длину филаментов DED [18]. Поэтому в данной работе мы поставили целью разработать систему ОДУ, с помощью которой можно анализировать эффекты FLIPin в различном клеточном контексте. В частности, было сосредоточено внимание на выявление зависимости активности FLIPin от длины различных филаментов DED и соотношения c-$FLIP_L$: прокаспаза-8.

Чтобы найти ответы на эти вопросы, была выбрана недавно разработанная система обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), описывающая воздействие FLIPin на гетеродимер каспаза-8/c-$FLIP_L$, и затем её расширили с учетом новой структурной информации, касающейся филаментов DED. С этой целью был добавлен дополнительный параметр, определяющий длину цепи DED. При построении структуры модели принят во внимание тот факт, что три цепи DED образуют один филамент DED, и что согласно результатам недавних протеомных исследований, в среднем, на одну цепь DED приходится одна молекула c-$FLIP_L$ [18]. Топология модели включала образование гомо- (прокаспаза-8/прокаспаза-8) и гетеродимеров (прокаспа-

Таблица 1. Обозначения, использованные в модели, и их исходные значения

Обозначения	Исходные условия для клеток HeLa-CD95	Описание
DED _chain_length	9,71	длина цепи DED в филаменте DED. Длину цепи рассчитывали из соотношения (P8+FLIP)/FLIP = DED chain length
FLIP	7,39 [нМ]	c-$FLIP_L$
P8	64,4 [нМ]	прокаспаза-8
C8	0	каспаза-8 (p43/p10)
FLIP_P8	0	гетеродимер *C*-концевых доменов c-$FLIP_L$ и прокаспазы-8 в DISC
P8_P8	0	гомодимер *C*-концевых доменов прокаспаза-8/прокаспаза-8 в DISC
C8_C8	0	гетеротетрамер каспазы-8 (p43/p10/p18/p10)
P8_C8	0	димер *C*-концевых доменов прокаспаза-8/каспаза-8 в DISC
FLIP_C8_FLIPin	0	каспаза-8/c-$FLIP_L$, стабилизированная FLIPin в DISC
CellDeathSubstrate	1	субстрат клеточной смерти
CellDeath	0	относительное количество погибших клеток
Procaspase-3	1,44 [нМ]	прокаспаза-3
Caspase-3	0	каспаза-3
σ_{FLIPin}	1 или 0 при условии, что FLIPin был добавлен или нет соответственно	коэффициент, который указывает на присутствие FLIPin
DISC_cat	$FLIP_P8 + FLIP_C8_FLIPin + 2 \cdot P8_C8 + 2 \cdot C8_C8 + 2 \cdot P8_P8$	суммарная каталитическая активность каспазы-8 в комплексе DISC

Таблица 2. Параметры модели

Параметр	Описание	Значения	Размерность
k_d	скорость димеризации (для каспаза-8/прокаспаза-8, прокаспаза-8/прокаспаза-8)	0,00102	[ч$^{-1}$·нМ$^{-1}$]
γ	коэффициент увеличения скорости димеризации комплексов прокаспаза-8/с-FLIP$_L$ и каспаза-8/каспаза-8	33,5796	–
k_p	скорость процессинга каспазой-8 субстратов DISC	3,14368	[ч$^{-1}$·нМ$^{-1}$]
k_{deg}	скорость деградации DISC	0,693	[ч$^{-1}$]
k_{cd}	скорость процессинга субстрата клеточной смерти, опосредованного каспазой-8	0,12875	[ч$^{-1}$·нМ$^{-1}$]
k_{cd_c3}	скорость процессинга субстрата клеточной смерти, опосредованного каспазой-3	0,15725	[ч$^{-1}$·нМ$^{-1}$]
k_{p3}	скорость процессинга прокаспазы-3 каспазой-8	0,02093	[ч$^{-1}$·нМ$^{-1}$]
k_{p3_c3}	скорость процессинга прокаспазы-3 каспазой-3	1,12659	[ч$^{-1}$·нМ$^{-1}$]

Примечание. Значения параметров взяты из работы [23].

за-8/с-FLIP$_L$) в составе филаментов DED (рис. 2). После образования гомо- и гетеродимеров прокаспаза-8 подвергается аутокаталитической активации в филаменте DED, после чего происходит внутри- и межмолекулярный процессинг димеров с образованием p43/p41 (p43-каспаза-8), p18 и p10 [10]. Также при построении топологии модели было сделано предположение, что как гомодимер прокаспаза-8/прокаспаза-8, так и продукты её расщепления, а именно p43-каспаза-8/p43-каспаза-8 и p18/p43-каспаза-8, обладают каталитической активностью в филаменте DED. Эти предположения были основаны на предыдущих сообщениях о том, что гомодимер прокаспаза-8a/b, а также продукт его расщепления p43/p41 обладают каталитической активностью, которая тесным образом связана с конформационными изменениями в активном центре при димеризации прокаспазы-8 и последующей активации димера [7, 11]. Другие предположения были сделаны в случае гетеродимера прокаспаза-8/с-FLIP$_L$. В этом случае было предположено, что только гетеродимер прокаспаза-8/с-FLIP$_L$ обладает каталитической активностью, в то время как продукт его расщепления p43-каспаза-8/с-FLIP$_L$ каталитически неактивен, и в отсутствие FLIPin происходит его быстрая диссоциация. Также было предположено, что связывание FLIPin приводит к восстановлению активности комплекса p43-каспаза-8/с-FLIP$_L$, достигая значений активности, характерных для гетеродимера прокаспаза-8/с-FLIP$_L$. Активация прокаспазы-8 сопровождается опосредованным каспазой-8 расщеплением прокаспазы-3 с образованием каспазы-3 и её последующей активацией, приводящей к гибели клетки. В структуре модели «общий уровень гибели клеток» соответствует уровню расщепленного субстрата клеточной смерти, который был интегрирован с течением времени. В структуру модели были включены процессинг субстрата клеточной смерти, происходящий как с участием каспазы-3, так и каспазы-8. Значения констант связывания и соответствующая параметризация были взяты из предыдущей модели процесса активации комплекса DISC при добавлении FLIPin, которая была получена на экспериментальных данных, полученных при работе с клетками HeLa-CD95 [23].

В настоящей работе, чтобы смоделировать эффекты FLIPin, основным предположением было то, что белок с-FLIP$_L$ ограничивает количество активной прокаспазы-8 в комплексе DISC путем остановки сборки филамента DED . В то же время было предположено, что повышение уровня с-FLIP$_L$ в составе DISC не влияет на соотношение FADD:с-FLIP$_L$. Кроме того, в структуре модели было заложено, что сборка филаментов DED происходит сразу после добавления CD95L. Точная стехиометрия филамента DED была определена начальными условиями модели. В частности, соотношения между прокаспазой-8 и с-FLIP$_L$ в комплексе DISC основывались на результатах количественного протеомного анализа, полученных в нашей предыдущей работе [18]. Данные результаты свидетельствуют о том, что в филаменте DED соотношения между этими белками примерно равны 1:9 (с-FLIP$_L$:прокаспаза-8). Однако при высоком уровне с-FLIP$_L$ соотношение с-FLIP$_L$ и прокаспазы-8 оказалось примерно равным 1 к 1 [18]. Таким образом, данные соотношения были

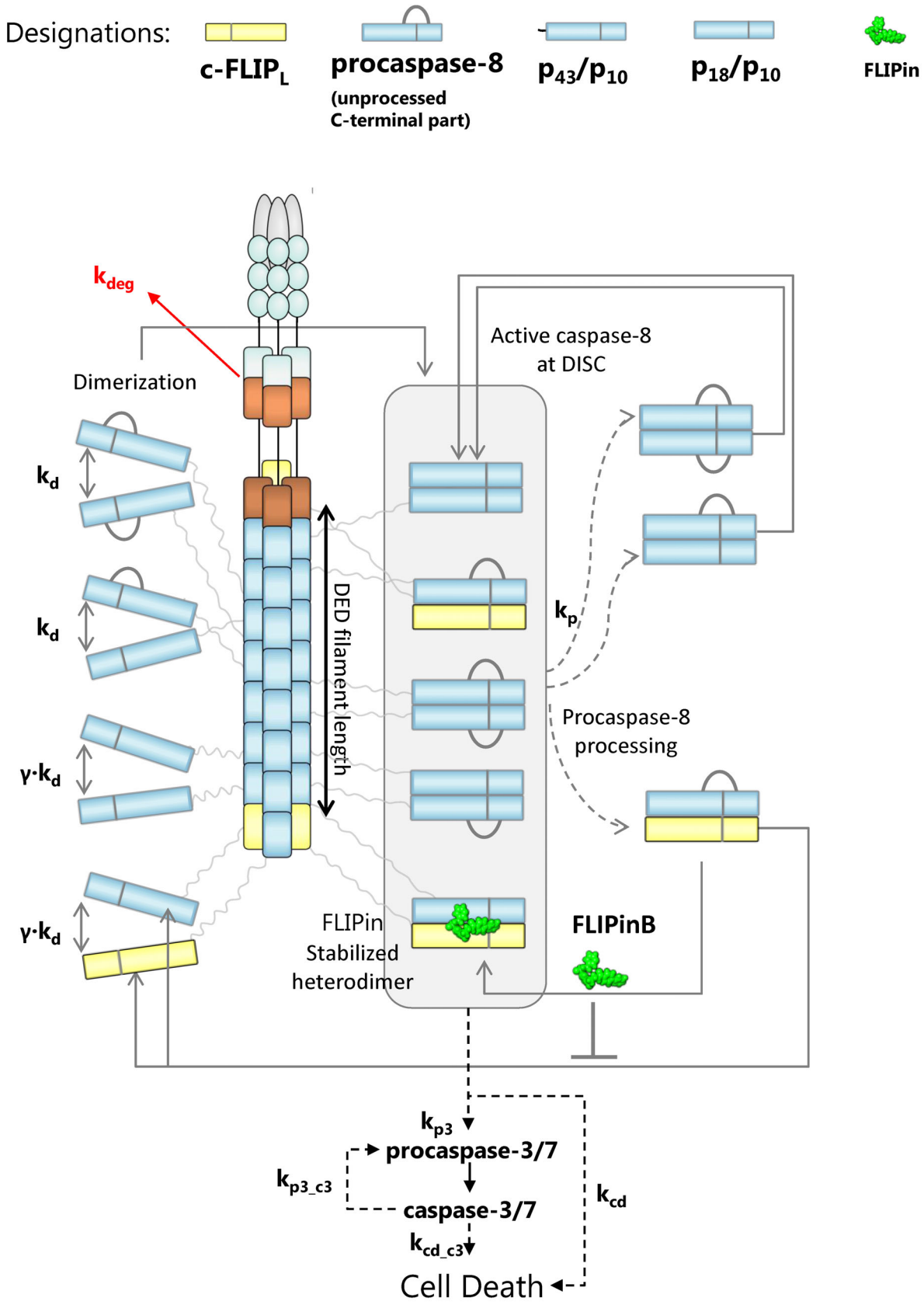


Рис. 2. Математическая модель процесса активации каспазы-8 в филаменте DISC/DED, учитывающая действие FLIPin. Указаны структура модели, объекты модели и константы взаимодействия

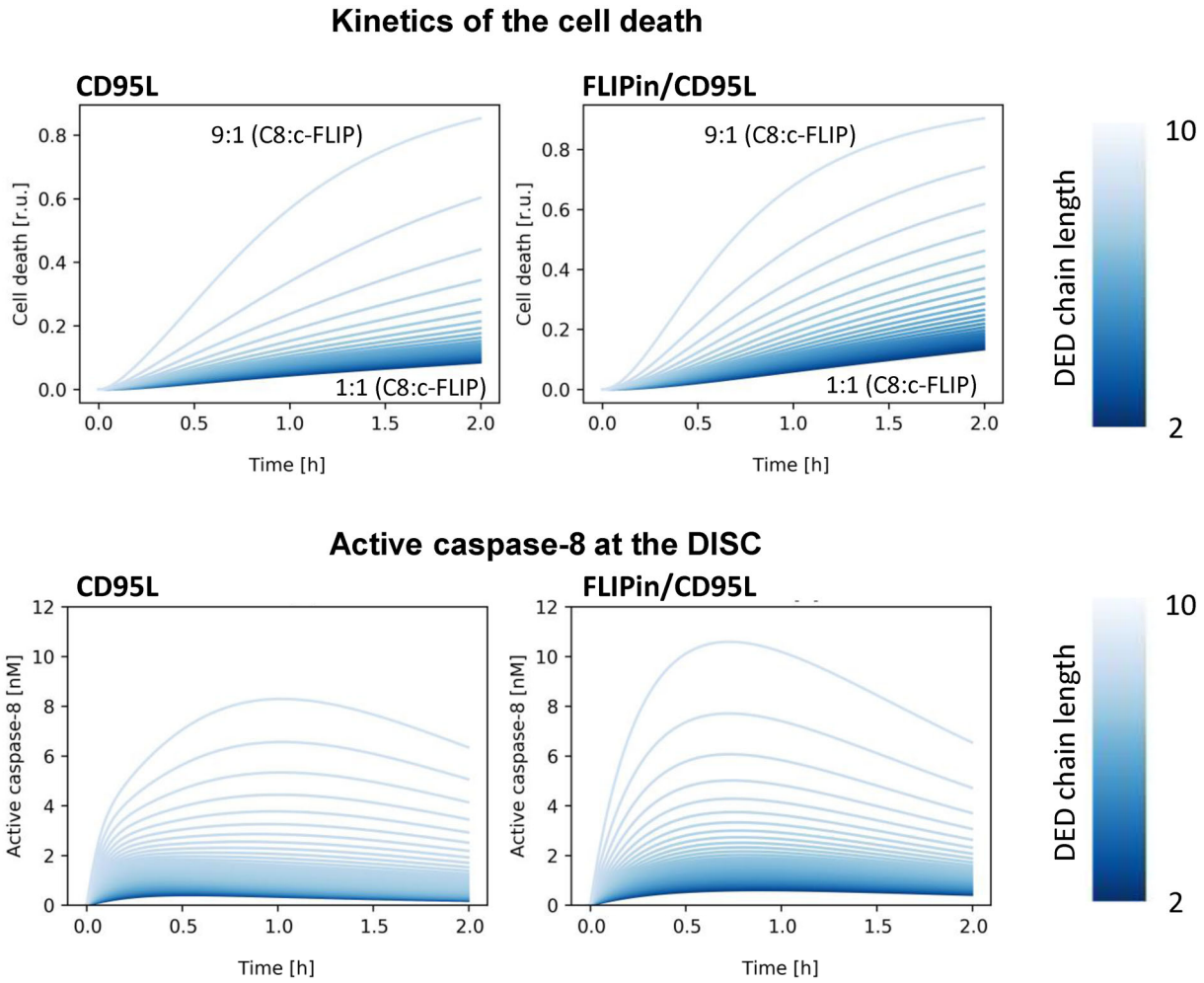


Рис. 3. Кинетика клеточной гибели (вверху) и активации каспазы-8 (внизу) при различных соотношениях прокаспазы-8 и c-FLIP. Показана кинетика в случае стимуляции только CD95L (слева) и совместной стимуляции CD95L и FLIPin (справа). Градиент интенсивности окраски от темного до светлого означает постепенное изменение длины цепи DED от короткой (соотношение c-FLIP:каспаза-8 равно 1 : 1, светлое окрашивание) до длинной цепи (соотношение c-FLIP:каспаза-8 равно 1 : 9, интенсивное окрашивание)

включены в модель, и следующим шагом было изучение поведения этой системы *in silico*.

С помощью математического моделирования можно предсказать усиление гибели клеток и повышение активности каспазы-8 малой молекулой FLIPin при различных соотношениях c-FLIP$_L$ и прокаспазы-8. На первом этапе был проведен анализ того, как активность FLIPin зависит от различного уровня белка c-FLIP$_L$ (рис. 3). Данные расчеты проводились при условии, что количество комплекса CD95/CD95L/FADD со временем не изменяется. Сначала было изучено влияние уровня c-FLIP$_L$ на каталитическую активность каспазы-8 и индукцию клеточной смерти *in silico*. Как и ожидалось, значения наивысшей активности каспазы-8 в комплексе DISC и наибольшего уровня индукции клеточной смерти были получены при низком уровне c-FLIP$_L$, который соответствует эндогенному уровню этого белка (рис. 3). В клетках HeLa-CD95 он соответствует соотношению, примерно равному 1:9 (c-FLIP$_L$:прокаспаза-8) в комплексе DISC (рис. 3). Максимальные значения активности каспазы-8 при этих соотношениях наблюдались примерно через 1 ч после стимуляции CD95L *in silico* (рис. 3). При увеличении уровня белка c-FLIP$_L$ активность каспазы-8 в комплексе DISC и уровень индукции клеточной гибели понижались (рис. 3). На втором этапе было изучено действие FLIPin. При совместной обработке клеток FLIPin и CD95L в соотношении 1:9 (c-FLIP$_L$:прокаспаза-8) максимальное значение активности каспазы-8 наблюдалось в более ранний момент времени, который соответствовал 45 мин после стимуляции CD95L. Кроме того, при совместной обработке CD95L и FLIPin *in*

silico общая активность каспазы-8 была выше, чем при обработке только CD95L (рис. 3). Повышение активности каспазы-8 и усиление клеточной гибели при совместной обработке CD95L и FLIPin также наблюдалось в случае всех изученных соотношений c-$FLIP_L$:прокаспаза-8 в комплексе DISC (рис. 3). Таким образом, с помощью модели была получена картина чувствительности комплекса к добавлению FLIPin, зависящая от уровня белка c-$FLIP_L$.

Затем было изучено, как длина филаментов DED влияет на активность FLIPin. Как было отмечено ранее, основным предположением модели было то, что увеличение уровня белка c-$FLIP_L$ приводит к уменьшению длины филамента DED. Укорочение филамента DED вызывает снижение количества прокаспазы-8 в филаменте DED. Это приводит к снижению активности каспазы-8 и индукции клеточной гибели, что нами наблюдалось *in silico* (рис. 3). Эти данные хорошо согласуются с наблюдениями Hillert et al. в условиях *in vitro* [18]. В частности, существенное снижение активности каспазы-8 и уровня клеточной смерти наблюдалось в клетках HeLa-CD95-FL, которые характеризуются повышенной экспрессией c-$FLIP_L$ [18]. Интересно, что в данных условиях ожидалось, что количество гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ увеличится, что может привести к увеличению активности каспазы-8, но эти предположения не оправдались из-за сильно уменьшенной суммарной концентрации прокаспазы-8 за счет уменьшения длины филамента DED [18].

Чтобы определить, как активность FLIPin зависит от длины филамента DED, был введен коэффициент эффективности действия FLIPin. Этот коэффициент рассчитывался как соотношение значений увеличения активности каспазы-8 в комплексе DISC и индукции гибели клеток при обработке только CD95L или CD95L/FLIPin. Более того, эффективность действия FLIPin была проанализирована для различных соотношений c-$FLIP_L$ и прокаспазы-8. Для этого были оценены значения длины филамента DED и соотношения c-$FLIP_L$:прокаспаза-8, при которых наблюдалась максимальная активность FLIPin *in silico*. Оказалось, что оптимальное значение длины филамента наблюдается при промежуточном диапазоне уровня экспрессии c-$FLIP_L$ (рис. 4). Увеличение гибели клеток достигало своего пика при соотношении c-$FLIP_L$:прокаспаза-8, примерно равном 1:3, приводя к увеличению более, чем на 80%, в то время как наивысшая активность каспазы-8 наблюдалась при соотношении 1:2 (c-$FLIP_L$:прокаспаза-8) и увеличении >140% (рис. 4). Предсказания, полученные на основе модели, показали, что данные соотношения c-$FLIP_L$ и прокаспазы-8 должны обеспечивать оптимальные соотношения между количеством гомодимеров прокаспазы-8 и гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$, создавая оптимальный ландшафт для эффективного действия FLIPin.

Далее была проведена проверка соответствия предсказаний, сделанных с помощью предложенной модели, известным внутриклеточным системам, в которых проверялось действие FLIPin. Протеомным анализом было показано, что в случае клеток HeLa-CD95 соотношение c-$FLIP_L$:прокаспаза-8 в комплексе DISC было примерно равно 1:9. Это приводит к относительно низкому уровню гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ [18]. На основе модели было предсказано, что в клетках HeLa-CD95 имеет место относительно низкий вклад гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ в повышение активности каспазы-8. Полученная оценка действительна для всех значений – временных интервалов, включая один час, который соответствует предсказанному максимуму активности CD95 DISC (рис. 3). Соответственно, это приводит к предсказанной *in silico* относительно низкой эффективности действия FLIPin в данной клеточной линии, которое действительно наблюдалось экспериментально [23]. В случае комплекса DISC в клетках HeLa-CD95-FL, которые характеризуются повышенной экспрессией белка c-$FLIP_L$, протеомный анализ показал соотношение c-FLIP: прокаспаза-8, равное 1:1 [18]. При этом соотношении происходит образование коротких филаментов DED, которые скорее всего в основном состоят из гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$. Интересно, что для данной клеточной линии предсказанный пик активности каспазы-8 соответствует периодам времени, которые превышают рассчитанное время полужизни комплекса DISC, что ограничивает активность FLIPin, которая напрямую связана с максимальной активностью каспазы-8. Другой линией клеток, для которой был проведен количественный протеомный анализ комплекса DISC, была B-лимфобластоидная клеточная линия SKW6.4 [5, 31, 32]. В этой линии клеток действие FLIPin было протестировано, однако, при этом не наблюдалось практически никакого действия со стороны этого соединения (данные не представлены). Это хорошо согласуется со стехиометрией комплекса DISC и филаментов DED в клетках SKW6.4. Последние содержат очень низкие количества c-$FLIP_L$ с таким соотношением к прокаспазе-8, которое очень близко к стехиометрии комплекса DISC в клетках HeLa-CD95, т.е. 1:9 (c-$FLIP_L$:прокаспаза-8). Кроме того, клетки SKW6.4 характеризу-

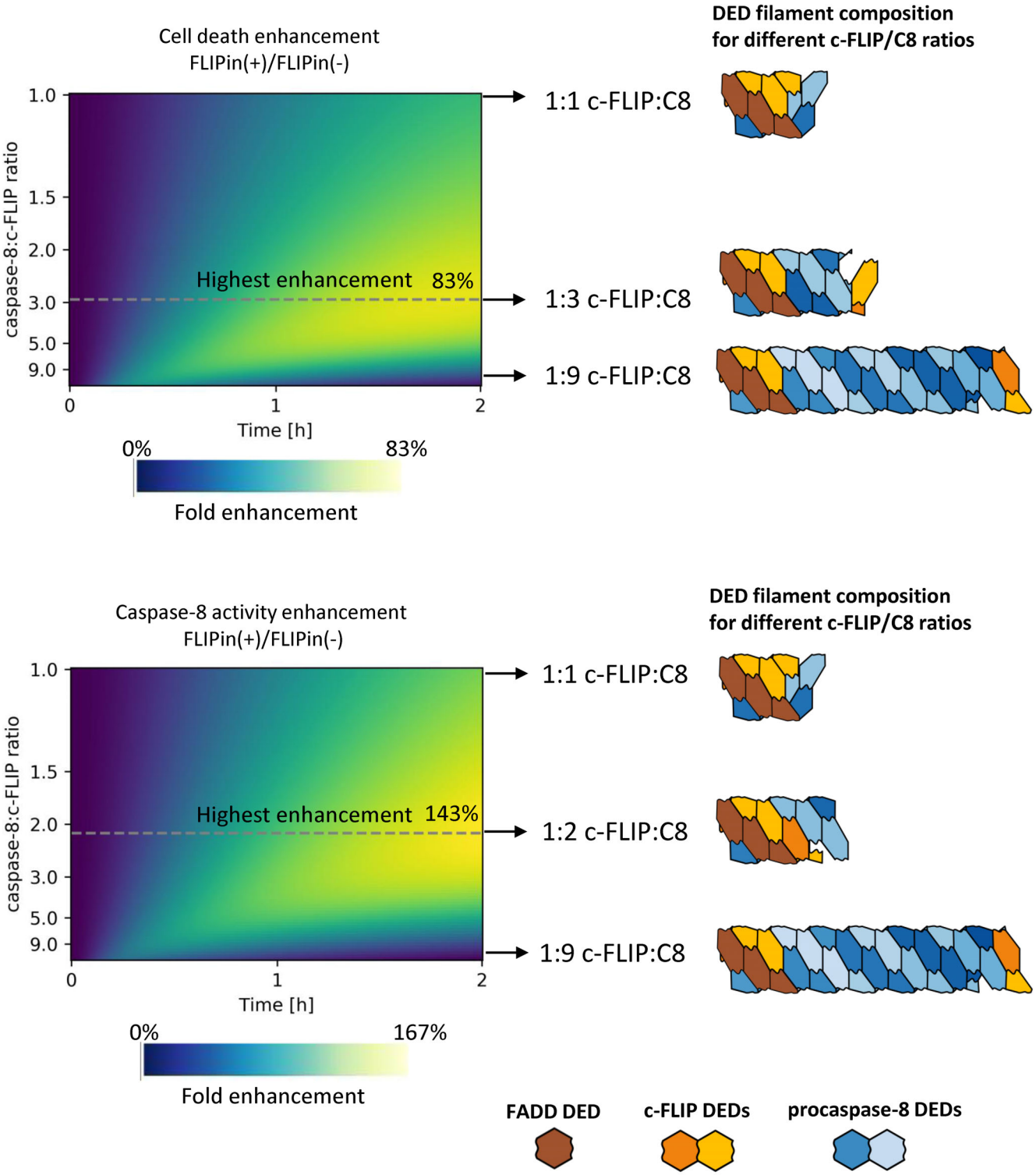


Рис. 4. Относительное усиление гибели клеток (вверху) и повышение активности каспазы-8 (внизу) при различных соотношениях c-FLIP и каспазы-8 в филаменте DED. Градиент интенсивности окрашивания обозначает кратное усиление окрашивания с помощью FLIPin. Филаменты DED, соответствующие наивысшей активности FLIPin, обозначены пунктирной линией. Эффекторные домены смерти (DEDs) белка FADD, прокаспазы-8 и белка c-FLIP показаны соответственно коричневым, синим и оранжевым цветом

ются более быстрой активацией каспазы-8 и индукцией апоптоза в сравнении с клетками HeLa-CD95 и более коротким временем полужизни комплекса DISC, которое, по-видимому, не позволяет детектировать влияние FLIPin на процесс активации каспазы-8. В целом, проведенный анализ хорошо объясняет полученные экспериментальные данные и позволяет предложить проведение скрининга различных типов клеток с целью идентификации клеточных линий, подходящих для наиболее эффективного действия FLIPin.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущей работе для создания малой молекулы (FLIPin), целенаправленно действующей на гетеродимер каспаза-8/c-$FLIP_L$, нами были применены современные методы компьютерной биологии *in silico* [23]. Было предсказано, что FLIPin будет имитировать стабилизирующий эффект петли L2′, находящейся в «закрытой» конформации, который приводит к повышению активности каспазы-8 в комплексе DISC и более эффективной индукции апоптоза. Экспериментальные данные, полученные с оптимизированной малой молекулой FLIPinBγ подтвердили предсказанный *in silico* механизм действия этого гетеродимера [23]. В настоящей работе с помощью компьютерного моделирования нами были изучены отдельные параметры, определяющие эффективность действия FLIPin. Нами было показано, что соотношение c-$FLIP_L$ и прокаспазы-8 в филаментах DED является ключевым фактором, определяющим эффективность действия данного соединения. Полученный результат вытекает не только из роли уровня c-$FLIP_L$ в осуществлении контроля соотношения между гомо- и гетеродимерами в комплексе DISC, но он также ассоциирован с ключевой функцией c-$FLIP_L$ в регуляции длины филамента DED.

Соотношения гомо- и гетеродимеров прокаспазы-8 в филаменте DED контролируются рядом факторов. В их число входят уровень внутриклеточной экспрессии белка c-$FLIP_L$ и прокаспазы-8, константы их ассоциации в комплексе DISC и структура филамента DED. Данные факторы связаны между собой нелинейной динамикой, которая может быть проанализирована на количественном уровне с использованием компьютерного моделирования. В настоящей работе была создана компьютерная модель, которая позволила предсказать уровень образующихся гетеродимеров в зависимости от соотношения прокаспазы-8 и c-$FLIP_L$ и от архитектуры филамента DED. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что уровень гетеродимеров в комплексе DISC является ключевым фактором для проявления активности FLIPin. Кроме того, выяснилось, что существуют дополнительные факторы, контролирующие активность FLIPin, такие как размер филамента DED. Таким образом, с помощью модели была изучена роль структуры филамента DED в способности FLIPin усиливать гибель клеток и активность прокаспазы-8.

Далее обнаружено, что повышение уровня экспрессии белка c-$FLIP_L$ непосредственно влияет на активность соединения FLIPin. Однако это влияние не носило линейный характер, в связи с чем применение метода математического моделирования для изучения данных эффектов представляет большой интерес. В частности, нелинейный характер объясняется множественной ролью белка c-$FLIP_L$ в регуляции активации каспазы-8, а именно его влиянием на длину филамента DED и вкладом гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ в суммарную активность каспазы-8 в комплексе DISC. Например, в клетках HeLa-CD95 имеется только ограниченное количество гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ по сравнению с гомодимерами каспазы-8, что ограничивает влияние FLIPin. Повышение концентрации c-$FLIP_L$ в филаменте DED должно привести к повышению количества гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ и увеличению активности FLIPin. В этой связи с использованием метода масс-спектрометрии было показано, что повышение концентрации белка c-$FLIP_L$ приводит к более эффективной концентрации гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ [18]. Однако данный процесс также ограничивает рост филамента DED, тем самым вызывая значительное снижение количества гомодимеров прокаспазы-8 и оказывая ингибирующее влияние на активность FLIPin. Это хорошо согласуется с экспериментальными данными, такими как не очень значительное повышение активности FLIPin, которое наблюдалось в клетках HeLa-FL при сильном повышении экспрессии c-$FLIP_L$ [23].

Результаты моделирования показали, что уровень белка c-$FLIP_L$ в комплексе DISC, оптимальный для действия FLIPin, находится в диапазоне значений соотношения c-$FLIP_L$/прокаспаза-8 между 1:9 и 1:1. В случае высокого содержания прокаспазы-8 или низкого уровня экспрессии белка $FLIP_L$ происходит быстрая активация каспазы-8, что выражается в низком вкладе стабилизированных гетеродимеров прокаспаза-8/c-$FLIP_L$ в увеличение активности прокаспазы-8. Напротив, в случае низкого со-

держания каспазы-8 или повышенной экспрессии c-$FLIP_L$ активность FLIPin ограничена короткими филаментами DED, приводя к пониженной активности каспазы-8. Кроме того, с помощью настоящей модели мы предсказываем, что наивысшая активность FLIPin наблюдается тогда, когда соотношение каспаза-8:c-$FLIP_L$ находится в диапазоне от 2:1 до 3:1. Так, при соотношении 2:1 (каспаза-8:c-$FLIP_L$) наблюдалось наибольшее увеличение скорости гибели клеток, а при соотношении 3:1 наблюдалась наивысшая активность каспазы-8 в DISC. В этой связи следует особо подчеркнуть, что ряд линий раковых клеток характеризуется высоким уровнем белка c-$FLIP_L$, который близок к количествам белка, предсказанным математической моделью для оптимального действия соединения FLIPin. Это позволяет предположить, что разработка химических соединений на основе FLIPin в целом обладает чрезвычайно высоким терапевтическим потенциалом для разработки методов лечения рака [33].

Модель ОДУ показала, что повышение активности каспазы-8 с помощью FLIPin сразу после стимуляции CD95L способствует индукции апоптоза. Последнее может быть тесным образом связано с высокой скоростью деградации комплекса DISC, которая было описана в работе [10]. Действительно, рассчитанное время полужизни комплекса DISC в клетках HeLa-CD95 равно лишь одному часу [10], в то время как, согласно нашей модели, требуется значительно больше времени, чтобы активировать все молекулы прокаспазы-8 в комплексе DISC. В этой связи наш подход показал, что увеличение времени активности гетеродимера через стабилизирующее влияние FLIPin может послужить многообещающей стратегией для разработки противораковой терапии.

Большинство уже созданных моделей CD95 DISC не учитывают образование филаментов DED и их структуру [27, 34, 35]. Это обеспечивает дополнительное важное направление в будущих исследованиях количественной динамики контроля апоптоза. Настоящее исследование показывает важность правильной стехиометрии и структуры филамента DED для эффективной индукции апоптоза, подчеркивая необходимость детального рассмотрения макромолекулярных комплексов, индуцирующих клеточную гибель, чтобы понять механизмы принятия решений в жизненном цикле клеток.

Представленная в настоящей работе модель может рассматриваться как минимальная модель для описания процессинга прокаспазы-8 в комплексе DISC. Данная модель была проверена с использованием экспериментальных данных, полученных на клеточной линии HeLa и фиксированной концентрации CD95L. В будущем может быть создана более детальная модель, которая будет учитывать явную динамику образования филамента DED при различной силе стимуляции CD95, а также учитывать пространственные ограничения процесса образования гетеродимеров c-$FLIP_L$ и каспазы-8. Кроме того, из предыдущих работ мы знаем, что низкие или т.н. пороговые концентрации CD95L регулируют длину цепей филаментов DED [5, 26–28]. Важным направлением будущих исследований является детальный анализ влияния на архитектуру филамента DED двух факторов, а именно, стимуляции пороговыми концентрациями CD95L и различных уровней экспрессии c-FLIP в клетке. Кроме того, рассмотрение сложных взаимодействий c-$FLIP_L$ и *C*-концевых доменов прокаспазы-8 представляет собой важный шаг на пути к количественному пониманию динамики филамента DED. В частности, взаимодействие близкорасположенных молекул DED в филаменте DED вероятно приводит к более эффективной димеризации *C*-концевых доменов, чем взаимодействие молекул, расположенных на удаленных участках в структуре филамента DED. В то же время стерические препятствия, вероятно, ограничивают активность каспазы-8 в коротких филаментах DED, которые соответствуют стехиометрии 1-2:1:1 для комплекса c-FLIP:прокаспаза-8:FADD. Детальное моделирование процесса сборки филамента DED и ингибирование данного процесса белком c-FLIP позволит выявить связи между уровнем эндогенной экспрессии c-FLIP, стехиометрией DISC и активностью FLIPin.

Таким образом, проведенное исследование показывает важность сочетания методов математического и структурного моделирования и системной фармакологии для определения молекулярных механизмов и разработки более эффективных терапевтических подходов в персонализированной медицине.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (19-54-45015; 18-04-00207) и Российского государственного бюджетного задания (АААА-А17-117092070032-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований, выполненных с участием авторов, в которых были бы использованы люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krammer, P. H., Arnold, R., and Lavrik, I. N. (2007) Life and death in peripheral T cells, *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 532-542.
2. Lavrik, I. N., and Krammer, P. H. (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC, *Cell Death Differ.*, **19**, 36-41.
3. Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I. N. (2015) Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 505-517.
4. Dickens, L. S., Boyd, R. S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. A., Robinson, G. L., Fairall, L., Schwabe, J. W., Cain, K., and Macfarlane, M. (2012) A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death, *Mol. Cell*, **47**, 291-305.
5. Schleich, K., Warnken, U., Fricker, N., Ozturk, S., Richter, P., Kammerer, K., Schnolzer, M., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2012) Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model, *Mol. Cell*, **47**, 306-319.
6. Fu, T. M., Li, Y., Lu, A., Li, Z., Vajjhala, P. R., Cruz, A. C., Srivastava, D. B., DiMaio, F., Penczek, P. A., Siegel, R. M., et al. (2016) Cryo-EM structure of caspase-8 tandem DED filament reveals assembly and regulation mechanisms of the death-inducing signaling complex, *Mol. Cell*, **64**, 236-250.
7. Hughes, M. A., Harper, N., Butterworth, M., Cain, K., Cohen, G. M., and MacFarlane, M. (2009) Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival, *Mol. Cell*, **35**, 265-279.
8. Yu, J. W., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2009) Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8169-8174.
9. Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex, *J. Biol. Chem.*, **277**, 45162-45171.
10. Kallenberger, S. M., Beaudouin, J., Claus, J., Fischer, C., Sorger, P. K., Legewie, S., and Eils, R. (2014) Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis, *Sci. Signal.*, **7**, ra23.
11. Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006) The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation, *Cell Death Differ.*, **13**, 489-498.
12. Hoffmann, J. C., Pappa, A., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2009) A new C-terminal cleavage product of procaspase-8, p30, defines an alternative pathway of procaspase-8 activation, *Mol. Cell Biol.*, **29**, 4431-4440.
13. Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC, *Cell Death Differ.*, **10**, 144-145.
14. Ivanisenko, N. V., and Lavrik, I. N. (2019) Mechanisms of procaspase-8 activation in the extrinsic programmed cell death pathway, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **53**, 830-837.
15. Ozturk, S., Schleich, K., and Lavrik, I. N. (2012) Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions, *Exp. Cell Res.*, **318**, 1324-1331.
16. Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14507-14513.
17. Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2010) Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and anti-apoptotic role of c-FLIPL, *J. Cell Biol.*, **190**, 377-389.
18. Hillert, L. K., Ivanisenko, N. V., Espe, J., Konig, C., Ivanisenko, V. A., Kahne, T., and Lavrik, I. N. (2020) Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly, *Oncogene*, **39**, 1756-1772.
19. Ueffing, N., Keil, E., Freund, C., Kuhne, R., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2008) Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment, *Cell Death Differ.*, **15**, 773-782.
20. Boatright, K. M., Deis, C., Denault, J. B., Sutherlin, D. P., and Salvesen, G. S. (2004) Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L), *Biochem. J.*, **382**, 651-657.
21. Pop, C., Oberst, A., Drag, M., Van Raam, B. J., Riedl, S. J., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2011) FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity, *Biochem. J.*, **433**, 447-457.
22. Hughes, M. A., Powley, I. R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J. W., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016) Co-operative and hierarchical binding of c-FLIP and caspase-8: a unified model defines how c-FLIP isoforms differentially control cell fate, *Mol. Cell*, **61**, 834-849.
23. Hillert, L. K., Ivanisenko, N. V., Busse, D., Espe, J., Konig, C., Peltek, S. E., Kolchanov, N. A., Ivanisenko, V. A., and Lavrik, I. N. (2020) Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer, *Cell Death Differ.*, **27**, 2117-2130.
24. Spencer, S. L., and Sorger, P. K. (2011) Measuring and modeling apoptosis in single cells, *Cell*, **144**, 926-939.
25. Flusberg, D. A., and Sorger, P. K. (2015) Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells, *Trends Cell Biol.*, **25**, 446-458.
26. Bentele, M., Lavrik, I., Ulrich, M., Stosser, S., Heermann, D. W., Kalthoff, H., Krammer, P. H., and Eils, R. (2004) Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis, *J. Cell Biol.*, **166**, 839-851.
27. Lavrik, I. N. (2014) Systems biology of death receptor networks: live and let die, *Cell Death Dis.*, **5**, e1259.
28. Schleich, K., and Lavrik, I. N. (2013) Mathematical modeling of apoptosis, *Cell Commun. Signal.*, **11**, 44.
29. Neumann, L., Pforr, C., Beaudouin, J., Pappa, A., Fricker, N., Krammer, P. H., Lavrik, I. N., and Eils, R. (2010) Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells, *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 352.
30. Buchbinder, J. H., Pischel, D., Sundmacher, K., Flassig, R. J., and Lavrik, I. N. (2018) Quantitative single cell analysis uncovers the life/death decision in CD95 network. *PLoS Comput. Biol.*, **14**, e1006368.
31. Warnken, U., Schleich, K., Schnolzer, M., and Lavrik, I. (2013) Quantification of high-molecular weight protein platforms by AQUA mass spectrometry as exemplified for the CD95 Death-Inducing Signaling Complex (DISC), *Cells*, **2**, 476-495.
32. Schleich, K., Buchbinder, J. H., Pietkiewicz, S., Kahne, T., Warnken, U., Ozturk, S., Schnolzer, M., Naumann, M., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2016) Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain, *Cell Death Differ*, **23**, 681-694.
33. Fulda, S. (2013) Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**, 195-201.

34. Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M., and Sorger, P. K. (2009) Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis, *Nature*, **459**, 428-432.

35. Aldridge, B. B., Gaudet, S., Lauffenburger, D. A., and Sorger, P. K. (2011) Lyapunov exponents and phase diagrams reveal multi-factorial control over TRAIL-induced apoptosis, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 553.

MATHEMATICAL MODELING REVEALS A ROLE FOR THE COMPOSITION OF DED FILAMENTS IN THE EFFECTS OF SMALL MOLECULES TARGETING CASPASE-8/c-FLIP$_L$ HETERODIMER

N. V. Ivanisenko[1] and I. N. Lavrik[1,2]*

[1] *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: n.ivanisenko@gmail.com*

[2] *Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg, 39106 Magdeburg, Germany; E-mail: ilav3103@gmail.com*

Received July 17, 2020
Revised July 24, 2020
Accepted July 24, 2020

Procaspase-8 activation at the death-inducing signaling complex (DISC) triggers extrinsic apoptotic pathway. Procaspase-8 activation takes place in the death effector domain (DED) filaments and is regulated by c-FLIP proteins, in particular, by the long isoform c-FLIP$_L$. Recently, the first-in-class chemical probe targeting the caspase-8/c-FLIP$_L$ heterodimer was reported. This rationally designed small molecule, FLIPin, enhances caspase-8 activity after initial heterodimer processing. Here, we used a kinetic mathematical model to gain an insight into the mechanisms of FLIPin action in a complex with DISC, in particular, to unravel the effects of FLIPin at different stoichiometry and composition of the DED filament. Analysis of this model has identified the optimal c-FLIP$_L$ to procaspase-8 ratios in different cellular landscapes favoring the activity of FLIPin. We predicted that the activity FLIPin is regulated via different mechanisms upon c-FLIP$_L$ downregulation or upregulation. Our study demonstrates that a combination of mathematical modeling with system pharmacology allows development of more efficient therapeutic approaches and prediction of optimal treatment strategies.

Keywords: apoptosis, DISC, caspase-8, FLIPin, DED, death receptors

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1344 – 1360

УДК 576.5

ПРОБЛЕМА ОБРАТИМОСТИ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Обзор

© 2020 И.И. Захаров, М.А. Савицкая, Г.Е. Онищенко*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: galina22@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2020
После доработки 23.07.2020
Принята к публикации 23.07.2020

Апоптоз – наиболее изученный вариант регулируемой клеточной гибели, который на протяжении долгого времени считался необратимым. В настоящее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что ключевые события апоптоза, такие как появление фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны, пермеабилизация внешней мембраны митохондрий, активация каспаз, повреждение ДНК и блеббинг цитоплазмы, не являются необратимыми, а также могут участвовать в процессах нормальной жизнедеятельности клетки, не связанных с осуществлением программы апоптоза. Анастаз – восстановление жизнеспособности клетки после индукции апоптоза – может происходить после устранения проапоптотических воздействий. Это явление способствует выживанию поврежденных нормальных или опухолевых клеток. В данном обзоре описаны процессы, характерные для апоптоза, однако не приводящие к гибели, – как в ходе нормальной жизнедеятельности клеток, так и при анастазе. Понимание механизмов и последствий обратимости апоптотических процессов, с одной стороны, может способствовать совершенствованию существующих методов терапии различных заболеваний, в том числе злокачественных новообразований, а с другой – открывает новые возможности для защиты клеточных элементов тканей и органов от гибели при лечении дегенеративных патологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, обратимость апоптоза, анастаз, активация каспаз, MOMP, экстернализация фосфатидилсерина, блеббинг.

DOI: 10.31857/S0320972520100036

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз — это вариант регулируемой клеточной гибели [1], широко распространенный в процессе онтогенетического развития многоклеточного организма. Апоптоз представляет собой последовательные молекулярные, структурные и физиологические преобразования клеток, завершающиеся их фрагментацией и утратой жизнеспособности, т.е. гибелью. Этот тип клеточной гибели играет важную роль во многих физиологических процессах, включая эмбриогенез, поддержание клеточного гомеостаза, дифференцировку и морфогенез тканей, в то время как его нарушения являются признаком многих патологий – от дегенеративных синдромов до опухолей и аутоиммунных заболеваний.

Последовательность процессов апоптоза, механизмы его индукции и регуляции исследуют на протяжении пятидесяти лет. Существует несколько путей инициации апоптотической гибели, включая рецептор-зависимый путь (TRAIL, TNFα и FAS), митохондриальный и ядерный пути и путь с участием стресса ЭПР [1, 2]. Сигнальные пути апоптоза многоступенчаты и сложны, но для апоптоза, инициация которого включает митохондриальный путь, можно выделить два ключевых этапа: пермеабилизация внешней мембраны митохондрий (MOMP) и активация каскада эффекторных каспаз. MOMP нарушает энергетическую функцию митохондрий; активация каскада эффекторных каспаз, в свою очередь, ведет к деградации белков клетки и повреждению генома посредством эндонуклеаз CAD и ENDOG. Разрывы ДНК активируют p53 и еще в большей степени поддерживают

Принятые сокращения: MOMP– mitochondrial outer membrane permeabilization; AIF– apoptosis-inducing factor; BID – BH3 interacting-domain death agonist; CAD – caspase-activated DNase; ENDOG– endonuclease G; TRAIL– TNF-related apoptosis-inducing ligand; TNFα –tumor necrosis factor α; FASLG – FAS-ligand; XIAP – X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis; BCL2 – B-cell lymphoma 2; BCL-XL – B-cell lymphoma extra large; SMAC – second mitochondria-derived activator of caspases; PARP – poly(ADP-ribose) polymerase; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

* Адресат для корреспонденции.

апоптотические сигнальные пути. Деградация ДНК, конденсация хроматина, фрагментация ядра и цитоплазмы с образованием апоптотических телец завершают апоптотическую клеточную гибель. Фосфатидилсерин (ФС), экспонированный на внешней стороне плазматической мембраны, служит сигналом «*eat me*» и стимулирует фагоцитоз апоптотических телец.

Апоптоз – наиболее изученный вид клеточной гибели. Неослабевающий интерес исследователей к данному явлению вызван рядом причин. Во-первых, существует фундаментальная биологическая проблема понимания роли апоптоза в поддержании баланса между клеточной пролиферацией и гибелью в разных тканях и органах животных и человека на протяжении всего онтогенетического существования организма. Во-вторых, в настоящее время хорошо известно, что в основе большого числа заболеваний самой разной природы, от инфекционных до генетических, лежат нарушения нормального течения апоптоза. Отсюда следует еще одна причина интереса к апоптотической гибели – действие многих терапевтических средств основано на блокировке или стимуляции процессов апоптоза.

Поиск все новых и новых химиотерапевтических препаратов для лечения различных заболеваний вызывает необходимость детального исследования отдельных звеньев апоптоза и определения того, какое из этих звеньев ведет к необратимой гибели клетки, т. е. является точкой невозврата (*point of no return*). В целом, исторически апоптоз считался необратимым процессом. Сложно представить, каким образом могут быть предотвращены катастрофические последствия пермеабилизации наружной мембраны митохондрий и активации эффекторных каспаз. Однако со временем стали накапливаться данные о том, что течение процессов апоптоза может быть приостановлено, и клетка способна восстанавливать свое исходное состояние [3–6]. Важная роль апоптотической гибели как в физиологических, так и в патологических процессах требует изучения обратимости отдельных апоптотических событий и апоптоза в целом.

Проблема обратимости апоптотических процессов, которой посвящен данный обзор, включает в себя несколько аспектов. Так, необходимо проанализировать, могут ли определенные составляющие апоптоза участвовать в событиях клеточной жизни, не связанных с гибелью: дифференцировке, в том числе терминальной, клеточном старении и развитии патологических состояний клеток. Исследования в этом направлении показали, что белки, традиционно считающиеся участниками апоптоза, могут быть вовлечены в процессы, с ним не связанные [7, 8]. Кроме того, появились данные о том, что структурно-функциональные изменения определенных клеточных компартментов и органелл, наблюдаемые при апоптозе, могут являться звеньями иных нелетальных процессов, например, терминальной дифференцировки. К таким процессам можно отнести: экспонирование фосфатидилсерина в наружный монослой плазматической мембраны, блеббинг плазматической мембраны, пермеабилизация мембран митохондрий. Это говорит о необходимости четкого определения явления обратимости апоптоза в целом и отличия проявления такой обратимости от нелетальных функций отдельных апоптотических процессов и белков.

Тема обратимости апоптоза предоставляет широкие возможности для исследований, и ее актуальность сложно переоценить. С одной стороны, обратимость апоптоза клеток новообразований открывает новый ранее неизвестный путь развития рецидивов и устойчивости после противоопухолевой терапии, основанной на апоптотической клеточной гибели. Понимание механизмов и последствий выживания клеток после инициации апоптоза и прекращения проапоптотического воздействия необходимо для улучшения существующих методов терапии, ликвидации побочных эффектов и разработки новых способов лечения. С другой стороны, изучение путей восстановления жизнеспособности клеток открывает новые механизмы сохранения и защиты клеточных элементов тканей и органов от апоптотической гибели в рамках терапии дегенеративных заболеваний, в том числе таких, как нейродегенеративные патологии, инфаркты, инсульты и СПИД.

ТЕРМИНЫ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ОБРАТИМОСТИ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В последние годы появляется все больше и больше данных, свидетельствующих о возможности обратимости апоптоза. Одно из первых определений, связанных с обратимостью апоптоза, — это «прерванный апоптоз» (*apoptosis interruptus*) [3]. Данный термин описывает выживание кардиомиоцитов в условиях сердечной недостаточности, несмотря на проявление классических признаков апоптоза: пермеабилизацию внешней мембраны митохондрий, выход цитохрома *c* в цитозоль и активацию каспазы-3. Важной особенностью *apoptosis interruptus* является сохранение целостности ядра апоптотических кардиомиоцитов и крайне низкий уровень

активности эндонуклеазы CAD. Предполагается, что выживанию кардиомиоцитов способствует повышенная экспрессия антиапоптотических факторов XIAP, BCL2 и BCL-XL [3].

Albeck et al. в 2008 г. описали состояние клетки, названное «частичная клеточная гибель» (*partial cell death*) [4]. В работе были использованы модифицированные клетки культуры HeLa и индукция апоптоза посредством лиганда TRAIL. Состояние частичной клеточной гибели связывают с активацией эффекторных каспаз, недостаточной для завершения апоптоза, но способной вызвать повреждение генома и протеома у выживших клеток. Согласно данным литературы, такое состояние может развиваться вследствие подавления MOMP повышенной экспрессией BCL2. В результате проапоптотический SMAC не попадает из митохондрий в цитозоль в высокой концентрации, и не происходит достаточного ингибирования XIAP. Все это приводит к постепенной, а не лавинообразной активации каспазы-3, частичному расщеплению ее мишеней и слабой, но продолжительной активации систем повреждения ДНК; апоптоз не завершается, и клетка не погибает. Авторы отмечают вероятные патологические последствия частичной клеточной гибели [4].

В 2012 г. Tang et al. [6] показали, что выживание клеток HeLa возможно после индукции апоптоза посредством инкубации с этанолом. В исследованных клетках после прекращения воздействия этанолом наблюдались ключевые признаки апоптоза — MOMP, активация каспазы-3, блеббинг цитоплазмы и разрывы нитей ДНК, однако апоптоз не завершался, и клетки восстанавливали свою морфологию и жизнеспособность. В этой работе был введен термин «анастаз» (англ. *anastasis*, от греч. ἀνάστασις— «воскрешение») — выживание клетки после инициации апоптоза. В последующих исследованиях были получены новые данные об этом процессе, выдвинуты гипотезы об этапах анастаза, разработаны новые методы его обнаружения, изучена возможность обратимости апоптоза *in vivo*. Анастаз — на данный момент самый распространенный термин, означающий выживание клетки после инициации апоптоза как на ранних, так и на поздних стадиях этого типа клеточной гибели.

Позднее появился термин «абортивный апоптоз» (*abortive apoptosis*), описывающий выживание клеток MCF10A после сублетального облучения, индукции MOMP и активации каспазы-3 [9].

В 2015 г. Ichim et al. [10] предложили термин «неудачный апоптоз» (*failed apoptosis*) — выживание клеток после инициации апоптоза воздействием лигандом TRAIL или сублетальными дозами ряда химических агентов. Так же как при частичной клеточной гибели, неудачный апоптоз, по мнению авторов, включает пермеабилизацию наружной мембраны лишь у части митохондрий [4], сублетальную активность каспазы-3 и повреждение ДНК за счет действия CAD, завершающееся выживанием клеток. Такие клетки, выживающие после реализации неполной программы апоптоза, в конечном итоге отличаются от исходных клеток, проявляя генетическую нестабильность, т.е. качество, характеризующее признаки онкогенеза [10, 11]. В этих работах не упоминается ранее введенный термин «анастаз», но определения, данные авторами, синонимичны этому термину. Важно отметить, что «абортивный апоптоз» и «неудачный апоптоз», в отличие от анастаза, не предполагают возможность восстановления жизнеспособности на поздних стадиях апоптоза.

Учитывая растущую популярность термина «*anastasis*» в англоязычной научной литературе, мы предлагаем использовать перевод этого термина – «анастаз» – для описания явления выживания клетки после индукции именно апоптотической клеточной гибели независимо от стадии, на которой развиваются процессы восстановления жизнеспособности клеток.

Согласно данным литературы, анастаз *in vivo* возможен [12], однако его нужно отличать от неапоптотической активации апоптотических каспаз. Также важно дифференцировать понятие анастаза от обратимости неапоптотических типов клеточной гибели, которая в последнее время также пробуждает большой исследовательский интерес [13, 14], однако до сих пор не получила четкого определения и обозначения.

АПОПТОТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ В НЕАПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Апоптоз представляет собой многоступенчатый процесс регулируемой гибели клеток, при котором различные события, связанные с утратой жизнеспособности, могут происходить как на морфологическом, так и на молекулярном уровне, последовательно или одновременно. Многие из этих событий традиционно рассматриваются как характерные признаки апоптоза и используются в качестве критериев для отнесения исследуемого типа клеточной гибели к апоптотическому. Примером могут служить появление фосфатидилсерина в наружном монослое плазматической мембраны, блеббинг, активация каспаз, пермеабилизация наружной митохондриальной мембраны. Тем не менее суще-

ствует целый ряд ситуаций, при которых эти признаки не сопровождаются дальнейшей апоптотической гибелью клетки, либо и вовсе встречаются в состояниях и процессах, не связанных с апоптозом и клеточной гибелью в целом. Так, показано, что ФС может переходить в наружный монослой плазматической мембраны и в ходе неапоптотических форм гибели клеток, например, некроптоза (программируемого некроза) [15]. Сходное явление характеризует также другие процессы, не связанные с апоптозом, такие как активация тромбоцитов [16], реакция клеток на гипоксию [17], злокачественная трансформация [18], дифференцировка, слияние клеток с формированием симпласта [19], миграция клеток [20]. ФС может присутствовать на поверхности некоторых нормальных клеток и постклеточных структур, в частности, форменных элементов крови — эритроцитов и тромбоцитов, где он выступает в качестве кофактора превращения протромбина в тромбин протромбиназным комплексом при активации системы свертывания крови.

Неапоптотический блеббинг часто связан с процессами клеточной подвижности [21], также встречается при цитокинезе в митозе, миграции, созревании и активации клеток иммунной системы, распластывании клеток на субстрате, при защитных реакциях на стресс, а также при пассировании культивируемых клеток с помощью трипсина [21, 22]. Примечательно, что неапоптотический блеббинг может сопровождать вирусные инфекции [21].

Каспазы, в том числе апоптотические, могут участвовать в воспалении, поддержании гомеостаза В-лимфоцитов, дифференцировке тканей, регенерации и развитии нейронов, образовании опухолей, старении, аутофагии, поддержании стабильности генома, а также в неапоптотических типах регулируемой клеточной гибели — пироптозе и некроптозе [7].

Остается открытым вопрос, каким образом активация апоптотических каспаз не всегда приводит к гибели клеток. Возможно, это достигается с помощью низкого уровня активности каспаз, недостаточного для индукции регулируемой гибели [23], либо благодаря ограничению их активности в пределах отдельных внутриклеточных компартментов или расщепления субстратов, не связанных с гибелью [8].

ОБРАТИМОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ

Как уже упоминалось, события, традиционно считающиеся характерными признаками апоптоза, участвуют в нормальных физиологических процессах, таких как дифференцировка или локомоция клеток, без последующей клеточной гибели. Немаловажный интерес представляют ситуации, при которых такие события происходят вследствие индукции апоптоза, но тем не менее, гибель не наступает, а клетка восстанавливает свою жизнеспособность посредством анастаза. С каждым годом количество данных, описывающих, каким образом апоптотические процессы могут быть остановлены или обращены вспять для обеспечения выживания клетки, быстро растет. Понимание обратимости отдельных апоптотических событий позволит создать полную картину механизмов анастаза.

Восстановление после пермеабилизации внешней мембраны митохондрий. Митохондрии являются для клетки жизненно важным биоэнергетическим источником, а также играют центральную роль в процессе апоптоза. По мнению многих исследователей, пермеабилизация внешней мембраны митохондрий считалась апоптотической точкой невозврата (*point of no return*), после прохождения которой выживание клетки невозможно [24]. Этот процесс приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, выходу цитохрома *c* в цитозоль с последующей активацией каскада эффекторных каспаз и повреждению генома [10]. Однако, несмотря на такие катастрофические последствия, клетка способна восстановить нормальную жизнедеятельность после MOMP, что подтверждают недавние исследования.

Исторически MOMP считалась событием, происходящим по принципу «все или ничего». Однако ряд научных работ показал, что это не так: часть митохондрий могут сохранять целостность своей внешней мембраны на протяжении процесса апоптоза. Такая пермеабилизация внешней мембраны только у части митохондрий возможна при инициации апоптоза под действием множества стимулов: индуктора апоптоза BH3-миметика ABT-737, который является аналогом проапоптотических белков BH3 и нейтрализует функции антиапоптотического белка BCL2 [10], лигандов клеточной гибели TRAIL [4], FASLG [25] и TNFα [26], желчной кислоты [25], протеасомного ингибитора MG132 [10], этопозида и паклитаксела [27], гиперэкспрессии BID [10], стауроспорина и ультрафиолетового излучения [26]. На данный момент в англоязычной литературе введены следующие термины, описывающие разную степень MOMP в клетке: widespread MOMP [27] — пермеабилизация внешней мембраны большинства митохондрий клетки; incomplete MOMP [26], minority MOMP [10] и limited MOMP [27] – пер-

меабилизация внешней мембраны только некоторых митохондрий клетки. Если при индукции апоптоза происходит пермеабилизация наружной мембраны митохондрий, локализацию цитохрома *c* в клетке используют для оценки MOMP. Отличия между нарушением проницаемости внешней мембраны большинства митохондрий (wMOMP) и лишь части митохондрий (iMOMP) можно выявить, определив количество цитохрома *c* в цитозоле с помощью конфокальной микроскопии [27] – чем более диффузно окрашена цитоплазма, тем больше цитохрома *c* покинуло митохондрии, и, следовательно, тем больше митохондрий пермеабилизовано. На данный момент неизвестны конкретные механизмы, позволяющие части митохондрий сохранить целостность внешней мембраны, однако вероятным объяснением является протекторное влияние повышенной экспрессии антиапоптотических белков семейства BCL2 [25, 26].

Как после iMOMP, так и после wMOMP клетка способна восстановить свою жизнеспособность. Клетки HeLa и MDA-MB-231 могут возвращаться к нормальной жизнедеятельности после инкубации с этопозидом (100 мкМ) и паклитакселом (200 нМ) соответственно в течение 24 ч. При этом происходит пермеабилизация внешней мембраны большинства митохондрий (wMOMP), что было выявлено с помощью конфокальной микроскопии клеток, экспрессирующих Cyt-*c*-GFP. После снятия апоптотического воздействия лишь малая часть клеток, претерпевших wMOMP (2–5%), выживает и пролиферирует, а цитохром *c* в таких клетках снова локализуется в митохондриях [27]. При iMOMP и wMOMP часть митохондрий сохраняют свою структурную целостность и продолжают поставлять энергию, необходимую для восстановления клетки. В поздней стадии анастаза фрагментированные митохондрии способны сливаться и восстанавливать свою нормальную морфологию [6, 12]. Однако для успешного протекания анастаза клетке необходимо также ликвидировать последствия MOMP: ингибировать цитозольный цитохром *c*, устранить проапоптотические факторы и удалить поврежденные митохондрии.

В результате секвенирования РНК анастатических клеток культуры первичных гепатоцитов мыши было обнаружено значительное увеличение экспрессии белков аутофагии ATG12 и SQSTM1 [28]. Возможно, аутофагия участвует в ликвидации поврежденных митохондрий и цитозольного цитохрома *c* в анастатических клетках. Известно, что ATG12 и SQSTM1 отвечают за митофагию и регуляцию гомеостаза митохондрий [29], а увеличение экспрессии ATG12 способствует быстрой деградации цитохрома *c* в цитозоле при отсутствии активации каскада эффекторных каспаз [30]. В течение анастаза в первичных гепатоцитах мыши также обнаружено увеличение экспрессии белков теплового шока HSPB1, DNAJB1, HSPA1A и HSP90AA1 (человеческие гомологи – HSP27, HSP40, HSP70 и HSP90 соответственно) [28]. Шапероны HSP27 и HSP70 способны предотвращать выход цитохрома *c* из митохондрий [29]. Также известно, что HSP40 и HSP70 подавляют активацию проапоптотического белка BID каспазой 8 и транслокацию проапоптотического BAX в наружную мембрану митохондрий, а HSP27 подавляет митохондриальную транслокацию tBID [29]. Далее показано, что повышенная экспрессия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) позволяет клеткам HeLa восстановить целостность внешней мембраны митохондрий, сохранить жизнеспособность и пролиферировать после индукции апоптоза актиномицином D в присутствии каспазного ингибитора [30]. Такое антиапоптотическое воздействие GAPDH наблюдается только в отсутствие активированных каспаз, однако можно предположить, что GAPDH играет роль в ликвидации MOMP в процессе анастаза. Все вышеперечисленные факторы могут являться потенциальными участниками механизмов анастаза, обеспечивающими удаление поврежденных митохондрий и деградацию цитохрома *c* в цитозоле, а также блокирующими реализацию митохондриального механизма апоптоза. Кроме того, важно отметить, что некоторые типы клеток, например, нейроны и кардиомиоциты, могут сохранять жизнеспособность после микроинъекции цитохрома *c* в цитоплазму [31]. Это позволяет предположить, что существуют механизмы деградации цитохрома *c* без активации апоптотического процесса.

Восстановление клеток после MOMP возможно и *in vivo*: при сердечной недостаточности многие кардиомиоциты претерпевают выход цитохрома *c* и активацию каспазы-3, однако в этих клетках не выявлено конденсации хроматина, блеббинга и фрагментации цитоплазмы, как и других признаков позднего апоптоза [3].

Остановка каскада эффекторных каспаз. Каскад эффекторных каспаз считается центральным событием апоптотической гибели, процессом, к которому приводит большинство путей инициации апоптоза. Активация эффекторных каспаз долгое время считалась необратимой, так как они поддерживают апоптоз через положительные обратные связи [4].

Однако в настоящее время существуют данные, подтверждающие возможность анастаза

даже после активации каскада эффекторных каспаз. Так, прижизненные наблюдения показали, что в клетках HeLa, экспрессирующих биосенсор к каспазе-3, происходит активация каспазы-3 после индукции клеточной гибели путем инкубации с этанолом [6, 12]. При этом такие клетки восстанавливали нормальную морфологию и функциональное состояние после удаления этанола из среды культивирования.

Анастаз после активации каспаз был обнаружен не только *in vitro*, но и *in vivo*. Выявление анастаза у лабораторных животных — технически сложная задача, так как анастатические клетки могут быть морфологически неотличимы от окружающих нормальных клеток. Tang et al. разработали биосенсор к эффекторным каспазам (*in vivo* CaspaseTracker) для *Drosophila*, состоящий из двух компонентов [12]. Активация каскада эффекторных каспаз в клетках с этим биосенсором вызывает временную экспрессию первого компонента – красного флуоресцентного белка. Второй компонент CaspaseTracker представляет собой зеленый флуоресцентный ядерный маркер (nucGFP), который постоянно экспрессируется после временной активации каскада каспаз в анастатических клетках и их потомках [12]. Также разработан биосенсор CasExpress, постоянно экспрессирующий nucGFP после временной активации каспазы-3 в клетках и их потомках, аналогичный по своему действию второму компоненту CaspaseTracker [32]. Исследования *Drosophila melanogaster* с биосенсором CaspaseTracker продемонстрировали, что после краткосрочного стрессового воздействия на животных (переохлаждение, голодание) происходит экспрессия зеленого и красного флуоресцентных белков в результате временной активации каспазы-3 в различных тканях, включая яичники [12, 33]. Нужно отметить, что биосенсоры были активированы как во время эмбриогенеза дрозофилы, так и во взрослом организме в различных тканях и органах, что может свидетельствовать об участии временной активации каскада каспаз в процессе развития насекомого [12, 32, 33].

Таким образом, можно сделать вывод, что активация эффекторных каспаз не является точкой невозврата. Одним из объяснений такой обратимости апоптотических событий может быть предположение о том, что неполная MOMP (iMOMP или wMOMP) вызывает ограниченный уровень активации каспаз 9, 7 и 3, которого недостаточно для полномасштабного осуществления гибели клетки, и жизнеспособность такой клетки может восстанавливаться [10]. Однако даже в этом случае клетке необходимо избавиться от активированных каспаз, локализованных в цитозоле. Конкретный механизм ликвидации каспаз неизвестен, как и неизвестно, насколько одинаковы механизмы выживания при анастазе и сохранения жизнеспособности при физиологической неапоптотической активности каспаз. Среди предполагаемых путей можно отметить группу белков теплового шока. HSP27 связывается с прокаспазой 3 и препятствует ее активации. HSP27, HSP70 и HSP90 могут подавлять формирование апоптосомы и активацию каспазы 9 [29]. Усиление экспрессии MDM2, убиквитинлигазы, отправляющей p53 на протеасомную деградацию [34], характерно для анастатических клеток. В результате снижается экспрессия проапоптотического белка BAX. Также MDM2 способен активировать антиапоптотический белок XIAP [35], что приводит к ингибированию инициаторных и эффекторных каспаз [36]. В дальнейшем предстоит детально исследовать, какие из этих процессов характеризуют анастаз, а какие присущи нелетальным функциям апоптотических процессов.

Репарация поврежденной ДНК. Важным признаком поздних стадий апоптоза является разрушение ДНК. За этот процесс ответственны апоптотические нуклеазы, такие как AIF, CAD и ENDOG; эффекторные каспазы также расщепляют белок PARP, участвующий в репарации ДНК.

В последние годы стало известно, что анастаз может происходить даже на поздних стадиях клеточной гибели. Первичные гепатоциты мыши и фибробласты NIH3T3 после инкубации с этанолом способны к анастазу, несмотря на выход AIF и ENDOG из митохондрий и расщепление PARP [6]. В большинстве анастатических клеток наблюдаются разрывы ДНК и хромосомные аберрации, могут появляться микроядра, некоторые клетки претерпевают опухолевую трансформацию [6, 10, 28]. В клетках HeLa и U2OS наблюдается увеличение числа разрывов ДНК после инкубации с индуктором апоптоза BH3-миметиком ABT-737 [10]. Авторы данного исследования сделали вывод о том, что клетки с повреждениями ДНК являются клетками, восстановившими жизнеспособность после реализации определенных, но не всех событий апоптоза. Это может означать, что такие клетки прошли анастаз.

Если анастаз осуществляется даже на таких поздних стадиях клеточной гибели, то можно предположить, что существуют пути ингибирования разрушения ДНК, характерного для позднего апоптоза. Конкретные механизмы этих путей неизвестны, однако многие анастатические факторы могут играть роль в процес-

сах предотвращения повреждения ДНК. Одним таким фактором является убиквитинлигаза MDM2: она вызывает деградацию опухолевого супрессора p53 и, тем самым, подавляет ассоциированное с p53 развитие митохондриального механизма апоптоза и соответствующее повреждение ДНК. Показано, что в анастатических клетках уровень экспрессии MDM2 повышается [28]. Также известно, что ингибитор нуклеазы CAD (ICAD) и белок репарации ДНК PARP играют роль в процессе анастаза: экспрессия ICAD и PARP возвращается к исходным показателям после удаления апоптотического стимула [6].

Далее показано, что через 6 ч после снятия проапоптотического воздействия в первичных гепатоцитах мыши наблюдается снижение экспрессии генов, кодирующих различные гистоны (*Hist1h2ah*, *Hist1h2ad*, *Hist1h2ai* и др.) [28]. По мнению авторов, такое снижение экспрессии генов гистонов в течение анастаза может быть связано с ответом клетки на повреждение генома: недавнее исследование показало, что деградация гистонов может сопутствовать и способствовать репарации ДНК [37].

Белок теплового шока HSP70 также может играть роль в снижении повреждений ДНК в течение анастаза. HSP70 способен взаимодействовать с AIF и ENDOG и, тем самым, препятствовать деградации ДНК [29], уровень экспрессии HSP70 повышен в течение анастаза [28]. Также известно, что в ходе анастаза возрастает экспрессия генов *Btg1*, *Cdkn1a* и *Trp53inp1*, участвующих в остановке клеточного цикла, это может способствовать репарации ДНК [28]. Аутофагия также может обеспечивать удаление не только поврежденных митохондрий, но и поврежденных хромосом и микроядер в анастатических клетках: экспрессия белков аутофагии ATG12 и SQSTM1 в первичных гепатоцитах мыши повышена через 3 ч и 6 ч после апоптоза [28]. В настоящее время остается неясным, какие именно типы аутофагии (базовая, митофагия, нуклеофагия) могут участвовать в процессе анастаза.

Несмотря на работу систем репарации в течение анастаза, клетка не может восстановить все повреждения ДНК. В подавляющем большинстве изученных случаев в анастатических клетках наблюдается накопление разрывов ДНК, образование микроядер и другие признаки генетических нарушений [5, 6, 9–11, 27]. Более того, в результате накопления повреждений ДНК опухолевые клетки могут становиться более злокачественными, а нормальные клетки — претерпевать опухолевую трансформацию [6, 9, 10, 27]. Последствия анастаза, связанные с этим, подробно описаны ниже в соответствующем разделе.

Ликвидация экстернализованного фосфатидилсерина. Анастаз после экстернализации ФС обнаружен *in vitro* в клетках карциномы молочной железы мыши MOD [38], первичных кардиомиоцитах мыши и клетках культуры HL1 [6, 12]. Восстановление клеток после экстернализации ФС также возможно *in vivo*. Фосфатидилсерин, меченный аннексином V, при индукции апоптоза ишемическим стрессом в кардиомиоцитах мыши и кролика первоначально обнаруживался на поверхности плазматической мембраны, позднее – внутри выживших клеток в составе везикул. В конечном итоге ФС не регистрировался на поверхности кардиомиоцитов, подвергавшихся ишемии [39]. Эти результаты свидетельствуют о возвращении ФС во внутренний монослой плазматической мембраны и восстановлении асимметричности распределения фосфолипидов, что говорит об обратимости ранних этапов апоптоза.

Известно, что клетки, выжившие после временной индукции апоптоза, сохраняют ФС, экспонированный во внешнем монослое, только в течение нескольких часов [6, 12]. Предполагается, что анастазирующим клеткам необходимо избавиться от экстернализованного фосфатидилсерина, чтобы избежать фагоцитоза. Вероятно, ликвидация фосфатидилсерина из внешнего монослоя плазматической мембраны является важной составляющей анастаза, хотя молекулярный механизм этого процесса остается неизвестным.

Слияние апоптотических телец. Финальной стадией апоптоза является распад клетки на апоптотические тельца с их последующим фагоцитозом. Однако есть данные, свидетельствующие о том, что анастаз может протекать даже после фрагментации клетки. Прижизненные наблюдения продемонстрировали, что после временной инкубации культуры HeLa со стауроспорином апоптотические тельца способны сливаться и образовывать клетки с морфологией, которая выглядит вполне нормальной [29]. Фрагменты клеток легочной карциномы H446 также могут сливаться после временной индукции апоптоза воздействием этанола [12]. Анастатические клетки имели повышенное число микроядер и хромосомных аберраций [6, 28]. Это свидетельствует о неспособности апоптотических телец с поврежденными хромосомами правильно соединяться с образованием одноядерной клетки, что, в свою очередь, может усиливать анеуплоидию опухолевых клеток [6, 12].

В настоящее время механизмы слияния апоптотических телец и последующего восста-

новления нормальной морфологии и функций клетки остаются неизвестными. Как уже упоминалось, недавние исследования демонстрируют важную роль экспонирования фосфатидилсерина на внешнюю сторону плазматической мембраны в процессах слияния клеток, таких как образование миотубул, слияние поврежденных аксонов и слияние макрофагов [29]. Можно предположить, что апоптотические тельца с экстернализованным ФС используют похожие механизмы для слияния и восстановления клетки.

ЭТАПЫ АНАСТАЗА

Анастаз не является мгновенным событием. От удаления проапоптотического стимула до восстановления нормального функционирования и морфологии клетки проходит период времени, который возможно поделить на отдельные этапы. В настоящее время материалов, затрагивающих проблему последовательности процессов анастаза, крайне мало. Sun et al. в 2017 г. [40] провели исследование транскриптома клеток HeLa в различные сроки после снятия проапоптотического воздействия. Они выявили две фазы анастаза: раннюю пролиферативную и позднюю миграционную фазы, отличающиеся группами экспрессируемых генов [40].

Для индукции апоптоза клетки HeLa инкубировали с 5%-ным этанолом в течение 3 ч. В культуре выявляли клетки с блеббингом, сжатием цитоплазмы и выходом цитохрома *c* в цитозоль. Окрашивание флуоресцентным зондом к каспазе-3 продемонстрировало ее активацию ~ в 75% клеток. После замены культуральной среды с этанолом на среду без этанола клетки восстановили нормальную уплощенную морфологию. Было произведено секвенирование РНК необработанных клеток, клеток после 3 ч инкубации с этанолом, а также клеток через 1, 2, 3, 4, 8 и 12 ч после прекращения инкубации с этанолом. Восстановление нормальной уплощенной морфологии произошло уже через ~ 4 ч. Для проверки результатов анализа транскриптома была использована ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Способность к анастазу и экспрессия генов также были исследованы в клетках HeLa после воздействия стауроспорина и после комбинированного воздействия TNFα и циклогексимида, а также в клетках глиомы человека H4 после инкубации с этанолом. Необходимо отметить, что лишь 5,6% клеток восстановили нормальную жизнедеятельность после инкубации с TNFα и циклогексимидом, что может быть связано с высокой аффинностью TNFα к его рецептору [40].

Анализ данных секвенирования РНК методом главных компонент выявил различия в двух группах анастазирующих клеток: клеток через 1–4 ч после снятия проапоптотического воздействия (ранняя фаза) и клеток через 8 и 12 ч (поздняя фаза). Эти две группы значительно отличались друг от друга и от исходных клеток, не подвергавшихся проапоптотическим воздействиям. Для сравнения транскрипции генов в ранней и поздней фазе анастаза была использована программа AutoSOME, анализ Gene Ontology (GO) и анализ сигнальных путей на основе Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG). Обнаружено, что в ранней фазе анастаза усиливается экспрессия 1172 генов, включая следующие группы генов (по GO): «регуляция клеточного цикла», «регуляция пролиферации», «регуляция клеточной гибели», «ответ на клеточный стресс», «модификация хроматина» и «регуляция транскрипции». Экспрессия генов последней группы («регуляция транскрипции») была значительно увеличена [40]. Кратковременная инкубация клеток HeLa и U2OS с сублетальной дозой ингибитора транскрипции актиномицина D сразу после удаления проапоптотического стимула значительно снижает число восстановившихся клеток [6]. В совокупности эти данные подтверждают ключевую роль транскрипции новых мРНК в анастазе. Также в ранней фазе анастаза повышена активность сигнальных путей, связанных с регуляцией клеточного цикла и выживанием клетки, таких как TGFβ, MAPK и Wnt (по KEGG). Данные об усилении экспрессии генов регуляции клеточного цикла и активации пролиферации подтверждают тот факт, что в течение ~11 ч после удаления проапоптотического стимула число клеток HeLa возрастало, а затем темпы роста популяции уменьшились [40].

В поздней фазе анастаза усиливается экспрессия 759 генов из следующих групп (по GO): «процессинг некодирующих РНК», «биогенез рибосом» и «экспрессия генов»; также повышена активность посттранскрипционных процессов (транспорт РНК, процессинг белков и эндоцитоз), формирования фокальных контактов и регуляции актинового цитоскелета (по KEGG). Усиление экспрессии генов регуляции адгезии и актинового цитоскелета могут свидетельствовать о том, что клетки через 8–12 ч после начала восстановления способны к миграции. Данная гипотеза была подтверждена моделированием раны *in vitro*: рана в монослое клеток в поздней фазе анастаза закрылась быстрее, чем рана в монослое контрольных клеток. Также большинство анаста-

зирующих клеток имело более продолговатую веретенообразную форму [40].

Часть генов ранней фазы анастаза также экспрессируются и во время апоптоза. Это позволяет предположить, что клетка «рассчитывает на выживание». Накопление мРНК, необходимых для анастаза, начинается еще до удаления апоптотического стимула, что объясняет быстрое восстановление жизнедеятельности клетки. Одна из них, мРНК транскрипционного фактора SNAIL, который имеет антиапоптотический эффект, может способствовать выживанию опухолевых клеток [41]. После индукции апоптоза инкубацией с этанолом и стауроспорином РНК-интерференция SNAIL препятствует восстановлению клеток HeLa и приводит к повышенному расщеплению PARP1 – белка, участвующего в репарации ДНК.

В рамках работы Seervi et al. [27] был проведен протеомный анализ клеток HeLa и MDA-MB-231 после инкубации с паклитакселом и этопозидом. Анализ результатов с использованием системы классификации PANTHER показал, что экспрессия белков трех сигнальных путей (ядерно-цитоплазматического транспорта, сигнального пути Ras и Redox-пути) повышена в анастатических клетках HeLa. Одним из ключевых белков ядерного экспорта является экспортин 1 (XPO1). Лептомицин B (специфический ингибитор XPO1) уменьшает число анастатических клеток HeLa и MDA-MB-231, т.е. клеток, восстановивших жизнеспособность после активации апоптоза. Сайленсинг XPO1 вызывает схожий эффект — нарушение восстановления жизнеспособности апоптотических клеток. Эти данные подтверждают важную роль ядерно-цитоплазматического транспорта в анастазе. Более того, ингибирование XPO1 существенно уменьшает устойчивость анастатических клеток к повторному воздействию паклитакселом и этопозидом, а также препятствует повышению их способности к миграции и инвазии. Основываясь на этих данных, можно предположить, что ингибирование ядерного экспорта предотвращает усиление злокачественности клеток в результате анастаза.

Важным фактом является то, что часть клеток может выжить в условиях проапоптотического стимула без инициации апоптоза. Анализ протеома данных клеток не выявил значительных отличий в экспрессии белков от контрольной группы [27]. Эти данные подтверждают, что в популяции присутствуют клетки, устойчивые к проапоптотическому воздействию. В дальнейшем необходимо более детальное исследование экспрессии генов таких клеток для понимания механизмов подобной резистентности (таблица).

ПОСЛЕДСТВИЯ АНАСТАЗА

Очевидным и важным последствием анастаза является само выживание клетки, вступившей в апоптоз. С одной стороны, для опухолевых клеток такое восстановление может увеличить риск рецидива и развития устойчивости после радиационной или химиотерапии. Для успешного лечения злокачественных новообразований необходимо дополнительное подавление анастаза или новые методики, основанные на индукции неапоптотической клеточной гибели. С другой стороны, анастаз в рамках терапии нейродегенеративных заболеваний открывает новые механизмы сохранения и защиты ценных нервных клеток от гибели. Это касается и других дегенеративных патологий. Не менее важным последствием анастаза является приобретение клетками новых, зачастую злокачественных свойств. В результате повреждения ДНК апоптотическими нуклеазами нормальные клетки могут претерпевать опухолевую трансформацию, а уже имеющиеся опухоли — прогрессировать. Также анастаз может играть роль в метастазировании, образовании стволовых клеток опухолей и приобретении лекарственной устойчивости после онкотерапевтических воздействий.

Анастаз вызывает повреждения ДНК, хромосомные аберрации и геномную нестабильность. Как уже было отмечено, анастаз может происходить даже на поздних стадиях апоптоза, когда системы разрушения ДНК, такие как ENDOG и CAD, уже задействованы, и начинается фрагментации ядра и цитоплазмы. В большинстве исследований, посвященных обратимости апоптоза, в популяциях анастатических клеток обнаружены разрывы ДНК, хромосомные аберрации, мутации, анеуплоидия и появление клеток с микроядрами.

Индукция апоптоза с помощью этанола в культурах HeLa, первичных гепатоцитов мыши и клеток культуры NIH3T3 приводит к увеличению числа клеток с микроядрами после снятия проапоптотического воздействия, что является важным признаком повреждения ДНК и хромосомных аберраций [6]. После прекращения инкубирования с этанолом также наблюдается увеличение числа клеток с повреждениями ДНК; метод ДНК-комет подтверждает накопление множества одно- и двунитевых разрывов. Еще одним последствием проапоптотического воздействия этанолом является расщепление важного компонента системы репарации ДНК — PARP, что также может способствовать накоплению повреждений ДНК в анастатических клетках [6].

Обработка клеток глиобластомы человека LN18 и мезенхимальных эмбриональных фиб-

Гены, экспрессия которых изменяется в процессе анастаза

№	Полное название гена	Обозначение гена	Изменение экспрессии	Ссылки
	Подавление апоптоза			
1	Mouse double minute 2	*Mdm2*	повышение	[28]
2	BCL2-associated athanogene 3	*Bag3*	повышение	[28]
3	Heat shock protein beta-1, HSP27 homolog	*Hspb1*	повышение	[28]
4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	*Dnajb1*	повышение	[28]
5	Heat shock protein 1A, HSP70 homolog	*HSPa1a*	повышение	[28]
6	HSP90 homolog	*HSP90aa1*	повышение	[28]
7	Rac family small GTPase 2	*RAC2*	повышение	[27]
8	Rac family small GTPase 3	*RAC3*	повышение	[27]
9	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	*PIK3R1*	повышение	[27]
	Остановка клеточного цикла			
10	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	*Btg1*	повышение	[28]
11	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	*p21/Cdkn1a*	повышение	[28]
12	Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1	*Trp53inp1*	повышение	[28]
	Компенсация повреждения ДНК			
13	Histone cluster 1, H2ah histone	*Hist1h2ah*	понижение	[28]
14	Histone cluster 1, H2ad histone	*Hist1h2ad*	понижение	[28]
15	Histone cluster 1, H2ai histone	*Hist1h2ai*	понижение	[28]
	Деградация поврежденных компонентов клетки			
16	Autophagy related 12	*Atg12*	повышение	[28]
17	Sequestosome-1	*Sqstm1*	повышение	[28]
	Регуляция транскрипции			
18	Activating transcription factor 3	*Atf3*	повышение	[28, 40]
19	FBJ osteosarcoma oncogene	*Fos*	повышение	[28, 40]
20	FBJ osteosarcoma oncogene B	*Fosb*	повышение	[28, 40]
21	Jun oncogene	*Jun*	повышение	[28, 40]
22	Jun-B oncogene	*Junb*	повышение	[28, 40]
	Ядерный транспорт			
23	Exportin 1	*XPO1*	повышение	[27]
24	Nuclear transport factor 2	*NUTF2*	повышение	[27]
25	Ran-specific binding protein 1	*RANBP1*	повышение	[27]
	Миграция и инвазия			
26	Snail family transcriptional receptor 1	*Snail1*	повышение	[28]
27	Snail homolog 1	*Snai1*	повышение	[28]
28	Matrix metallopeptidase 9	*Mmp9*	повышение	[28]
29	Matrix metallopeptidase 10	*Mmp10*	повышение	[28]
30	Matrix metallopeptidase 13	*Mmp13*	повышение	[28]
	Ангиогенез			
31	Angiopoietin-like 4	*Angptl4*	повышение	[28]
32	Vascular endothelial growth factor A	*Vegfa*	повышение	[28]
33	Placenta growth factor	*PGF*	повышение	[40]
34	Ephrin B1	*EFNB1*	повышение	[40]
35	Ephrin B2	*EFNB2*	повышение	[40]
36	Ephrin type-A receptor 2	*EPHA2*	повышение	[40]
37	Ephrin type-B receptor 2	*EPHB3*	повышение	[40]

Примечание. Гены разделены на группы по их предполагаемым функциям. Данные получены на клетках культуры HeLa [27, 40], HepG2 и первичных гепатоцитах мыши [28]. Результаты получены с помощью анализа протеома и подтверждены методом ПЦР в реальном времени.

робластов (MEF) *in vitro* сублетальными концентрациями TRAIL и FASLG (индукторами рецептор-зависимого пути апоптоза), а также цисплатином, который активирует ядерный механизм апоптоза, вызывает мутации в локусе фосфорибозилтрансферазы (HPRT) [11]. Фосфорилированный гистон H2AX (γH2AX) является маркером повреждений ДНК. Цитометрический анализ показал дозозависимое увеличение количества клеток LN18 и MEF с внутриядерными фокусами γH2AX после обработки всеми перечисленными индукторами. Сайленсинг мРНК каспазы 8 или РНК-интерференция CAD предотвращают повреждение ДНК и мутации HPRT. Это подтверждает ключевую роль каспаз и CAD в дестабилизации генома анастатических клеток [11].

Сразу после инкубации клеток HeLa и U2OS с BH3-миметиком ABT-737 было выявлено увеличение числа разрывов ДНК [10]. Как уже упоминалось, это показывает анализ фокусов γH2AX и метод ДНК-комет. Роль нуклеазы CAD в повреждении ДНК при действии сублетальных доз ABT-737 была проанализирована на клетках HeLa и U2OS, в которых методом редактирования генома CRISPR/Cas9 был создан дефицит гена, кодирующего CAD. Для доказательства участия каспазы-3 в повреждениях генома при воздействии сублетальными дозами ABT-737 были использованы клетки MCF-7 с делецией гена каспазы-3. Оказалось, что клетки HeLa и U2OS, дефицитные по CAD, и клетки MCF-7 с делецией гена каспазы-3 устойчивы к воздействию ABT-737, что еще раз подтверждает участие каскада каспаз и CAD в возникновении повреждений ДНК. Важно отметить, что в этих экспериментах была показана корреляция уровня повреждения ДНК со степенью iMOMP. Это может свидетельствовать о связи между уровнем активности митохондриального механизма апоптоза и степенью повреждения ДНК в клетках, восстановивших свою жизнеспособность, т.е. в анастатических клетках.

Более того, было обнаружено, что сублетальные дозы ABT-737 могут вызывать повреждение ДНК и *in vivo*: после инъекции мышам ABT-737 происходило увеличение числа γH2AX в клетках прямой кишки. При этом не наблюдалось увеличения частоты апоптотической гибели.

Связь между восстановлением жизнеспособности клеток после неполной пермеабилизации наружной мембраны митохондрий и повреждением генома была продемонстрирована также на модифицированных клетках линии MelJuSo. В этих клетках можно индуцировать экспрессию BID на разном уровне. Оказалось, что экспрессия сублетальной дозы BID индуцирует iMOMP, частичный выход цитохрома *c* в цитозоль и повреждение ДНК. Эти нарушения можно предотвратить с помощью повышенной экспрессии BCL-XL или воздействием Q-VD-OPh — ингибитора активации каспаз-3, 8 и 9. Сублетальная доза FASLG также приводит к повреждению ДНК в клетках U2OS, и эти нарушения генома могут быть предотвращены гиперэкспрессией BCL-XL или ингибированием каспаз [10].

Инкубация клеток с ABT-737 или экспрессия BID способствуют не только повреждению ДНК, но также хромосомным аберрациям и геномной нестабильности. Периодическая обработка клеток HeLa и U2OS сублетальными дозами ABT-737 или сублетальная экспрессия BID в течение 5 или 10 пассажей приводит к значительному и дозозависимому увеличению числа клеток с микроядрами. Повышение экспрессии BCL-XL или ингибирование каспаз Q-VD-OPh предотвращает появление микроядер, что подтверждает роль iMOMP в развитии геномной нестабильности [10]. Воздействие сублетальными дозами ABT-737 также способствует амплификации генов *in vitro* в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы мыши (PDAC), иммортализованных эмбриональных фибробластах мыши 3T3-SA и клетках фибросаркомы мыши WEHI-S. Гиперэкспрессия BCL-XL в этих клетках предотвращает амплификацию генов [10].

Сублетальное облучение клеток может вызывать повреждение ДНК с участием каспазы-3. Liu et al. в 2015 г. [9] показали, что после радиационной обработки (ионизирующее излучение ^{56}Fe) в клетках культуры MCF10A, IMR90 и первичных эмбриональных фибробластах мыши наблюдается повышение уровня γH2AX, и это увеличение коррелирует с количеством активированной каспазы-3 и апоптотической нуклеазы ENDOG. Важно отметить, что число индуцированных радиацией фокусов γH2AX повышено даже через 3 месяца после облучения. Нокдаун каспазы-3 значительно снижает уровень повреждения ДНК, в то время как нокдаун каспазы 7 вызывает меньший эффект. Экспрессия белка p53 сохраняется на повышенном уровне в течение 10 дней после облучения клеток, однако остается неясным, как присутствие этого белка связано с повреждением ДНК в анастатических клетках: нокдаун p53 не влияет на образование фокусов γH2AX [9].

После воздействия стауроспорином также, как и после облучения, наблюдается формирование фокусов γH2AX в ядрах первичных эмбриональных фибробластов мыши; нокдаун каспазы-3 почти полностью предотвращает данный

эффект [9]. Облучение мышей C57BL/6 вызывает хромосомные аберрации в клетках костного мозга. *Casp3*$^{-/-}$ C57BL/6 мыши в меньшей степени подвержены хромосомным аберрациям в результате облучения [9]. Это еще раз свидетельствует об участии процессов обратимости апоптоза в возникновении генетической нестабильности клеток.

Существует одна положительная сторона повышения генетической нестабильности опухолевых клеток в результате анастаза: мутации могут привести к опухолевой прогрессии, однако они также увеличивают число и разнообразие неоантигенов опухоли. Согласно последним исследованиям, увеличение числа мутаций и неоантигенов повышает вероятность распознавания злокачественных клеток иммунной системой и может повысить эффективность иммунологических методов противоопухолевой терапии [42].

Анастаз способствует опухолевой трансформации и прогрессии. Значительное число недавних исследований подтверждает, что клетки, выжившие после сублетального воздействия множеством различных апоптотических индукторов, претерпевают схожие изменения, связанные с повреждением ДНК: аккумулируют мутации, амплифицированные гены и хромосомные аберрации. Геномная нестабильность может приводить к опухолевой трансформации нормальных клеток и в сочетании со стимуляцией эпителиально-мезенхимального перехода и ангиогенеза способствовать прогрессии злокачественных новообразований.

Активация каспазы-3 играет важную роль в опухолевом гомеостазе и прогрессии. Например, клетки рака прямой кишки HCT116 с нокдауном каспазы-3 имеют существенно более низкую способность к субстрат-независимому росту, инвазии и формированию метастазов, чем HCT116, содержащие функциональную каспазу-3. Также нокдаун каспазы-3 увеличивает чувствительность к радиационной терапии как *in vitro*, так и *in vivo*: темпы пролиферации *Casp3*$^{-/-}$ HCT116 после облучения различными дозами рентгеновского излучения значительно ниже, чем у HCT116 дикого типа [43].

Клетки MCF10A, получившие сублетальную дозу радиации, приобретают способность к субстрат-независимому росту, что является важным признаком опухолевой трансформации. При этом клетки с повышенной активностью каспазы-3 с большей частотой формировали субстрат-независимые колонии, чем клетки с более низкой активностью данного фермента. РНК-интерференция и нокдаун гена каспазы-3 значительно снижают способность облученных клеток MCF10A к субстрат-независимому росту. Такие данные в очередной раз подтверждают важную роль каспазы-3 в опухолевой трансформации клеток. Эти клетки после облучения также образуют опухоли при инъекции в мышь C57BL/6 *Nude* [9].

Ген *MLL* (*KMT2A*) смешанной лейкемии часто подвергается перестройкам и является важным участником онкогенной программы для различных типов лейкемии. Исторически считалось, что мутации *MLL* связаны с терапией ингибиторами топоизомеразы II. Однако современные исследования продемонстрировали возможное участие каскада каспаз в этом процессе: ингибирование активности каспазы-3 и CAD снижает частоту мутаций в локусе *MLL* [44]. Учитывая важную роль каспазы-3 и CAD в апоптозе, можно предположить, что анастаз также способствует онкогенным мутациям.

Индукция рецепторного пути апоптоза также может способствовать опухолевой прогрессии. TRAILR используется в качестве мишени селективных противоопухолевых химиотерапий, так как клетки многих типов опухолей имеют повышенную экспрессию TRAILR. Современные исследования показывают, что TRAILR-сигналинг играет роль в опухолевой прогрессии [45]. В мышиных моделях рака легкого и поджелудочной железы человека (NSCLC и PDAC) активация рецептора TRAILR2 стимулирует пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток. Нокдаун *Trail* в модели аденокарциномы поджелудочной железы мыши увеличивает шансы на выживание животного и уменьшает частоту метастазирования. Данные клинических исследований подтверждают гипотезу о роли TRAILR в злокачественной трансформации и прогрессии опухолей: высокая экспрессия TRAILR2 коррелирует с низкой вероятностью выживания мышей и развитием метастазов в случаях рака прямой кишки [45]. Это позволяет предположить, что именно анастатические клетки, которые возникли после индукции апоптоза за счет активации рецепторного механизма с участием TRAILR2, являются клеточными источниками более злокачественного и метастазирующего типа опухолей.

Как и TRAILR, FAS может выполнять несколько онкогенных функций, включая стимуляцию пролиферации и миграции [46]. Ингибирование сигнального пути FAS блокирует опухолевую трансформацию в различных мышиных моделях [47].

Примечательной особенностью анастаза является то, что антиапоптотические факторы, необходимые для выживания и восстановления

клетки, стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [48]. ЭМП — смена фенотипа клетки с эпителиального на мезенхимальный. Клетка теряет полярность, адгезию к соседним клеткам и приобретает способности к миграции и инвазии, характерные для мезенхимальных клеток. ЭМП играет важную роль в заживлении ран и эмбриональном развитии, а также участвует в прогрессии опухолей и метастазировании.

Исследование транскриптома клеток HeLa в разные промежутки времени в течение анастаза [40] показало, что через 8–12 ч после снятия проапоптотического воздействия активны сигнальные пути, ассоциированные с формированием фокальных контактов и перестройкой актинового цитоскелета [27, 40]. Помимо этого, экспрессия транскрипционного фактора SNAIL1, как уже упоминалось, значительно увеличена и необходима для протекания анастаза в клетках HeLa [40]. SNAIL1 подавляет синтез E-кадгерина и тем самым стимулирует ЭМП. Сигнальные пути TGFβ, Ras/MAPK и Wnt также активны на ранней стадии анастаза; все эти пути ассоциированы не только с выживанием, но и с ЭМП. Экспрессия матричных металлопротеаз MMP9, MMP10, MMP13 – ферментов, необходимых для преодоления клеткой базальной мембраны в процессе инвазии, – увеличена в поздней стадии анастаза [28, 40]. Таким образом, анастаз способен стимулировать ЭМП и способствовать метастазированию клеток новообразований.

Анастаз может благоприятствовать трансформации клеток опухолей в опухолевые стволовые клетки. Опухолевые стволовые клетки более устойчивы к лекарственным воздействиям и часто являются причиной рецидивов новообразований. Недавнее исследование продемонстрировало повышенную экспрессию маркера стволовости CD44 в некоторых анастатических клетках рака молочной железы MCF-7, T47D и MDA-MB-231 *in vitro* и *in vivo*. Предварительное подавление или стимуляция метилирования ДНК нарушает стволовую трансформацию раковых клеток, что свидетельствует о важной роли эпигенетической регуляции в этом процессе [49].

Известно, что в ходе анастаза происходит увеличение продукции факторов ангиогенеза [28, 40]. Экспрессия ангиогенных факторов семейства эфринов (EFNB1, EFNB2) и их рецепторов значительно увеличена в течение анастаза в клетках HeLa [40]. Экспрессия фактора роста плаценты (PGF) значительно повышена на протяжении суток после индукции апоптоза в клетках HeLa. PGF связывается с рецептором VEGF и способствует ангиогенезу путем стимуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия [50]. Экспрессия ангиопоэтин-подобного белка 4 (ANGPL4) и фактора роста сосудов A (VEGFA) также повышена в течение анастаза в культурах клеток HepG2 и первичных гепатоцитах мыши [28]. С одной стороны, стимуляция ангиогенеза благоприятствует быстрому восстановлению тканей после ишемии или других повреждений. Однако развитие новых кровеносных сосудов также может способствовать злокачественной трансформации и метастазированию опухолевых клеток, и вместе с другими онкогенными последствиями анастаза создает крайне опасное сочетание.

Анастаз способствует приобретению лекарственной устойчивости. Одним из важных последствий повреждения ДНК, геномной нестабильности и увеличения частоты мутаций в результате анастаза является ускорение отбора опухолевых клеток, устойчивых к лекарственным воздействиям. Так, после индукции апоптоза этопозидом и паклитакселом клетки HeLa и MDA-MB-231 становятся более устойчивыми к повторному воздействию — доля выживших анастатических клеток выше на 15–30% [27]; это свидетельствует о возникновении лекарственной устойчивости к этопозиду и паклитакселу. Культивирование клеток лимфомы мыши LyBcl2-6 и LyBcl2-9 с периодической обработкой BH-3-миметиком ABT-199 (также известен как венетоклакс) приводит к приобретению устойчивости к воздействию ABT-199 и частичной устойчивости к другим противоопухолевым препаратам; мутации в семействе генов *Bcl2* предотвращают связывание белка с BH-3-миметиком. Можно предположить, что повреждение ДНК и аккумуляция мутаций в результате сублетального проапоптотического воздействия ABT-199 способствует приобретению лекарственной устойчивости к данному препарату [51]. После длительного воздействия TRAIL клетки *Bax*$^{-/-}$ HCT116 теряют чувствительность к TRAIL в результате снижения экспрессии TRAILR и приобретают устойчивость к комбинированному воздействию TRAIL и бортезомиба или MG-132 [52].

Учитывая результаты данных исследований, можно предположить, что вне зависимости от выбранного апоптотического индуктора анастаз может способствовать развитию лекарственной устойчивости. Важно отметить, что возможно появление не только специфической устойчивости к противоопухолевому агенту, но и потеря чувствительности к некоторым комбинированным терапиям. Таким образом, анастаз может явиться еще одним механизмом

Позитивные и негативные последствия обратимости апоптоза. Представлены доказанные экспериментально и предполагаемые физиологические функции анастаза, а также его патологические эффекты. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

развития множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток. Так как приобретение лекарственной устойчивости после периода противоопухолевой химиотерапии играет ключевую роль в рецидивах новообразований, исследование роли анастаза в формировании такой устойчивости требует самого пристального внимания и более широкого исследования.

На протяжении длительного времени апоптоз считался необратимым процессом. Относительно недавно появились данные о возможности выживания клеток после инициации апоптоза [5, 6]. В различных работах были предприняты попытки найти «точку невозврата» — апоптотическое событие, после которого клетка неминуемо погибает. Обилие результатов исследований, полученных в последние годы, ставит под сомнение существование такой универсальной «точки». Обратимость отдельных апоптотических событий в рамках апоптоза и анастаз в целом обнаружены в разнообразных модельных системах как *in vitro*, так и *in vivo;* также наблюдается обратимость апоптоза, протекающего по различным механизмам инициации, включая рецептор-зависимый [4, 25, 26], митохондриальный [9, 10], ядерный [9, 26, 27] и с участием стресса ЭПР [10]. Обнаружено, что выживание клетки возможно даже на поздних стадиях апоптоза, несмотря на пермеабилизацию внешней мембраны митохондрий [4, 10, 25–27], разрушение ДНК апоптотическими нуклеазами [5, 6, 9–11, 27] и распад клетки на апоптотические тельца [29].

Возможно, мы получим более полное понимание апоптоза и анастаза, если будем рассмат-

ривать обратимый апоптотический процесс как взаимодействие проапоптотических и антиапоптотических сигналов. Недавние исследования подтверждают, что синтез мРНК некоторых факторов выживания, необходимых для анастаза, начинается еще во время воздействия апоптотическим стимулом [28, 40] — таким образом клетка «готовится» выжить. Если апоптотический стимул достаточно силен и продолжителен, возможна устойчивая активация проапоптотических сигналов, запуск положительных обратных связей и быстрое завершение апоптоза. Если апоптотический стимул оказывается кратковременным или сублетальным, клетка может инициировать апоптоз, но не достичь необходимого уровня проапоптотических сигналов — апоптотического плато [4]. Неустойчивый баланс проапоптотических и антиапоптотических факторов может сместиться как в сторону гибели, так и в сторону выживания.

Возникает вопрос, может ли анастаз, как и отдельные апоптотические события, играть роль в физиологических процессах? Апоптотические каспазы, чья активность не приводит к запуску гибели клеток, принимают участие в развитии и регенерации многих тканей, таких как волокна хрусталика, форменные элементы крови, костная ткань. Также активность каспаз важна при развитии и дифференцировке нервной ткани и в осуществлении функциональной активности центральной нервной системы [7]. Анастаз в сочетании с компенсаторной пролиферацией может служить механизмом восстановления после повреждения тканей организма. Этим же целям может служить анастаз в сочетании с аутофагией (рисунок).

Временная активация апоптотических каспаз возможна и в половых клетках *D. melanogaster in vivo* после переохлаждения или голодания животных [12]. Вероятно, анастаз служит механизмом усиления мутагенеза в ответ на внешний стресс, что, в свою очередь, может способствовать ускорению отбора более приспособленных организмов. Однако геномная нестабильность, ассоциированная с анастазом, также может являться причиной появления генетических заболеваний (рисунок).

Как и проблема анастаза, обратимость неапоптотических видов клеточной гибели на данный момент исследована недостаточно. Лишь в последние годы были опубликованы данные, свидетельствующие о возможности выживания клеток после инициации ферроптоза [14], некроптоза и пироптоза [13]. Дальнейшее изучение обратимости неапоптотических видов клеточной гибели расширит понимание физиологических процессов, ассоциированных с этими типами гибели клеток, и положит основы для разработки новых методов терапии заболеваний, связанных с гибелью или выживанием клеток.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-015-0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death. Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
2. Savitskaya, M. A., and Onishchenko, G. E. (2015) Mechanisms of apoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1613-1627, doi: 10.1134/S0006297915110012.
3. Narula, J., Haider, N., Arbustini, E., and Chandrashekhar, Y. (2006) Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure – seeing hope in death, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, **3**, 681-688, doi: 10.1038/ncpcardio0710.
4. Albeck, J. G., Burke, J. M., Aldridge, B. B., Zhang, M., Lauffenburger, D. A., and Sorger, P. K. (2008) Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells, *Mol. Cell*, **30**, 11-25, doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.012.
5. Tang, H. L., Yuen, K. L., Tang, H. M., and Fung, M. C. (2009) Reversibility of apoptosis in cancer cells, *Br. J. Cancer*, **100**, 118-122, doi: 10.1038/sj.bjc.6604802.
6. Tang, H. L., Tang, H. M., Mak, K. H., Hu, S., Wang, S. S., Wong, K. M., Wong, C. S. T., Wu, H. Y., Law, H. T., Liu, K., Talbot Jr., C. C., Lau, W. K., Montell, D. J., and Fung, M. C. (2012) Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2240-2252, doi: 10.1091/mbc.E11-11-0926.
7. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.*, **22**, 526-539, doi: 10.1038/cdd.2014.216.
8. Espinosa-Oliva, A. M., García-Revilla, J., Alonso-Bellido, I. M., and Burguillos, M. A. (2019) Brainiac caspases: beyond the wall of apoptosis, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 500, doi: 10.3389/fncel.2019.00500.
9. Liu, X., He, Y., Li, F., Huang, Q., Kato, T. A., Hall, R. P., and Li C.-Y. (2015) Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis, *Mol. Cell*, **58**, 284-296, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.003.
10. Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S. U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., et al. (2015) Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic in-stability in the absence of cell death, *Mol. Cell*, **57**, 860-872, doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.018.

11. Lovric, M. M., and Hawkins, C. J. (2010) TRAIL treatment provokes mutations in surviving cells, Oncogene, **29**, 5048-5060, doi: 10.1038/onc.2010.242.
12. Tang, H. L., Tang, H. M., Marie Hardwick, J., and Fung, M. C. (2015) Strategies for tracking anastasis, a cell survival phenomenon that reverses apoptosis, *J. Vis. Exp.*, **16**, 1-13, doi: 10.3791/51964.
13. Gong, Y. N., Crawford, J. C., Heckmann, B. L., and Green, D. R. (2019) To the edge of cell death and back, *FEBS J.*, **286**, 430-440, doi: 10.1111/febs.14714.
14. Tang, H. M., and Tang, H. L. (2019) Cell recovery by reversal of ferroptosis, *Biol. Open*, **8**, 1-10, doi: 10.1242/bio.043182.
15. Shlomovitz, I., Speir, M., and Gerlic, M. (2019) Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death, *Cell Commun. Signal.*, **17**, 139, doi: 10.1186/s12964-019-0437-0.
16. Rote, N. S., Ng, A. K., Dostal-Johnson, D. A., Nicholson, S. L., and Siekman, R. (1993) Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **66**, 193-200, doi: 10.1006/clin.1993.1025.
17. Boyle, E. M., Pohlman, T. H., Cornejo, C. J., and Verrier, E. D. (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion, *Ann. Thor. Surg.*, **62**, 1868-1875, doi: 10.1016/s0003-4975(96)00950-2.
18. Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaider, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K., and Zweytick, D. (2011) In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 2638-2645, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.026.
19. Van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M., and Ramaekers, F. C. (2001) Transient ex-pression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation, *J. Cell. Sci.*, **114 (Pt. 20)**, 3631-3642.
20. Vogt, E., Ng, A. K., and Rote, N. S. (1996) A model for the antiphospholipid antibody syn-drome: monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **174**, 700-777, doi: 10.1016/s0002-9378(96)70453-2.
21. Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 730-736, doi: 10.1038/nrm2453.
22. Khajah, M. A., and Luqmani, Y. A. (2016) Involvement of membrane blebbing in immunological disorders and cancer, *Med. Princ. Pract.*, **25 Suppl. 2**, 18-27, doi: 10.1159/000441848.
23. Aram, L., Yakobi-Sharon, K., and Arama, E. (2017) CDPs: caspase-dependent non-lethal cellular processes, *Cell Death Differ.*, **24**, 1307-1310, doi: 10.1038/cdd.2017.111.
24. Green, D. R., Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., and Evan, G. I. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant, *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 156-162, doi: 10.1038/35004029.
25. Xu, Y., Surman, D. R., Diggs, L., Xi, S., Gao, S., et al. (2020) Bile acid-induced "Minority MOMP" promotes esophageal carcinogenesis while maintaining apoptotic resistance via Mcl-1, *Oncogene*, **39**, 877-890, doi: 10.1038/s41388-019-1029-6.
26. Tait, S. W. G., Parsons, M. J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D. R. (2010) Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria, *Dev. Cell.*, **18**, 802-813, doi: 10.1016/j.devcel.2010.03.014.
27. Seervi, M., Sumi, S., Chandrasekharan, A., Sharma, A. K., and Santhosh-Kumar, T. R. (2019) Molecular profiling of anastatic cancer cells: potential role of the nuclear export pathway, *Cell Oncol.*, **42**, 645-661, doi: 10.1007/s13402-019-00451-1.
28. Tang, H. M., Talbot, Jr., C. C., Fung, M. C., and Tang, H. L. (2017) Molecular signature of anastasis for reversal of apoptosis, *F1000Research*, **6**, 43, doi: 10.12688/f1000research.10568.1.
29. Tang, H. M., and Tang, H. L. (2018) Anastasis: recovery from the brink of cell death, *R. Soc. Open Sci.*, **5**, 180442, doi: 10.1098/rsos.180442.
30. Colell, A., Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., et al. (2007) GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome *c* release in the absence of caspase activation, cell, **129**, 983-997, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.045.
31. Potts, M. B., Vaughn, A. E., McDonough, H., Patterson, C., and Deshmukh, M. (2005) Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP, *J. Cell Biol.*, **171**, 925-930, doi: 10.1083/jcb.200504082.
32. Ding, A. X., Sun, G., Argaw, Y. G., Wong, J. O., Easwaran, S., and Montell, D. J. (2016) CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development *in vivo*, *Elife*, **5**, 1-20, doi: 10.7554/eLife.10936.
33. Tang, H. M., Fung, M. C., and Tang, H. L. (2018) Detecting anastasis *in vivo* by caspase-tracker biosensor, *J. Vis. Exp.*, **132**, 54107, 1-12, doi: 10.3791/54107.
34. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, **387**, 296-299, doi: 10.1038/387296a0.
35. Gu, L., Zhu, N., Zhang, H., Durden, D. L., Feng, Y., and Zhou, M. (2009) Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation, *Cancer Cell*, **15**, 363-375, doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.002.
36. Flanagan, L., Sebastià, J., Tuffy, L. P., Spring, A., Lichawska, A., Devocelle, M., Prehn, J. H. M., and Rehm, M. (2010) XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis, *Cell Death Dis.*, **1**, 1-13, doi: 10.1038/cddis.2010.26.
37. Hauer, M. H., Seeber, A., Singh, V., Thierry, T., Sack, R., Amitai, A., Kryzhanovska, M., Eglinger, J., Holcman, D., Owen-Hughes, T., and Gasser, S. M. (2017) Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 99-107, doi: 10.1038/nsmb.3347.
38. Geske, F. J., Lieberman, R., Strange, R., and Gerschenson, L. E. (2001) Early stages of p53-induced apoptosis are reversible, *Cell Death Differ.*, **8**, 182-191, doi: 10.1038/sj.cdd.4400786.
39. Kenis, H., Zandbergen, H. R., Hofstra, L., Petrov, A. D., Dumont, E. A., Blankenberg, F. D., Haider, N., Bitsch, N., Gijbels, M., Verjans, J. W. H., Narula, N., Narula, J., and Reutelingsperger, C. P. M. (2010) Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging, *J. Nucl. Med.*, **51**, 259-267, doi: 10.2967/jnumed.109.068429.
40. Sun, G., Guzman, E., Balasanyan, V., Conner, C. M., Wong, K., Zhou, H. R., Kosik, K. S., and Montell, D. J. (2017) A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death, *J. Cell Biol.*, **216**, 3355-3360, doi: 10.1083/jcb.201706134.
41. Wan, Z., Pan, H., Liu, S., Zhu, J., Qi, W., Fu, K., Zhao, T., and Liang, J. (2015) Downregulation of SNAIL sensitizes Hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF-κB pathway, *Oncol. Rep.*, **33**, 1560-1566, doi: 10.3892/or.2015.3743.
42. Germano, G., Lamba, S., Rospo, G., Barault, L., Magrì, A., et al. (2017) In-activation of DNA repair triggers neoanti-

gen generation and impairs tumour growth, *Nature*, **552**, 1-5, doi: 10.1038/nature24673.
43. Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., and Li, C.-Y. (2018) Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells, *Int. J. Cancer*, **143**, 921-930, doi: 10.1002/ijc.31374.
44. Betti, C. J., Villalobos, M. J., Diaz, M. O., and Vaughan, A. T. M. (2003) Apoptotic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division, *Cancer Res.*, **63**, 1377-1381.
45. Von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., von Karstedt, S., Conti, A., et al. (2015) Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-Driven cancer progression, invasion, and metastasis, *Cancer Cell*, **27**, 561-573, doi: 10.1016/j.ccell.2015.02.014.
46. Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, W., and Ceppi, P. (2015) The role of CD95 and CD95 ligand in cancer, *Cell Death Differ.*, **22**, 549-559, doi: 10.1038/cdd.2015.3.
47. Hadji, A., Ceppi, P., Murmann, A. E., Hadji, A., Ceppi, P., et al. (2014) Death induced by CD95 or CD95 ligand elimination, *Cell Rep*, **7**, 208-222, doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.035.
48. Chakraborty, S., Mir, K. B., Seligson, N. D., Nayak, D., Kumar, R., and Goswami, A. (2020) Integration of EMT and cellular survival instincts in reprogramming of programmed cell death to anastasis, *Cancer Metastasis Rev.*, **39**, 553-566, doi: 10.1007/s10555-020-09866-x.
49. Xu, Y., So, C., Lam, H. M., Fung, M. C., and Tsang, S. Y. (2018) Apoptosis reversal promotes cancer stem cell-like cell formation, neoplasia (United States), **20**, 295-303, doi: 10.1016/j.neo.2018.01.005.
50. De Falco, S. (2012) The discovery of placenta growth factor and its biological activity, *Exp. Mol. Med.*, **44**, 1-9, doi: 10.3858/emm.2012.44.1.025.
51. Fresquet, V., Rieger, M., Carolis, C., García-Barchino, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2014) Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma, *Blood*, **123**, 4111-4119, doi: 10.1182/blood-2014-03-560284.
52. Somasekharan, S. P., Koc, M., Morizot, A., Micheau, O., Sorensen, P. H. B., Gaide, O., Andera, L., and Martinou, J.-C. (2013) TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis, *Apoptosis*, **18**, 324-336, doi: 10.1007/s10495-012-0782-6.

THE PROBLEM OF APOPTOTIC PROCESSES REVERSIBILITY

Review

I. I. Zakharov, M. A. Savitskaya, and G. E. Onischenko*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: galina22@mail.ru

Received July 10, 2020
Revised July 23, 2020
Accepted July 23, 2020

Apoptosis is the best understood variant of regulated cell death, which has been considered irreversible for a long time. To date, an increasing amount of data has been accumulating indicating that key events of apoptosis, such as the externalization of phosphatidylserine, mitochondrial outer membrane permeabilization, caspase activation, DNA damage, and cytoplasmic blebbing are not irreversible and can be involved in the normal cell functioning not associated with the induction of apoptosis. Anastasis – cell recovery after induction of apoptosis – can occur following elimination of proapoptotic stimuli. This can facilitate survival of damaged or tumor cells. This review describes key processes of apoptosis, which do not necessarily lead to cell death during normal cell activity as well as anastasis. Understanding mechanisms and consequences of apoptotic processes reversibility, on the one hand, could contribute to the improvement of existing therapeutic approaches for various diseases, including malignant neoplasms, and, on the other hand, could open up new possibilities for protecting cellular elements of tissues and organs from death during treatment of degenerative pathologies.

Keywords: apoptosis, apoptosis reversibility, anastasis, caspase activation, MOMP, PS externalization, blebbing

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1361 – 1371

УДК 577.152.23

ТРАНСГЛУТАМИНАЗА 2-ГО ТИПА УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ГОМЕОСТАЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2020 С. Оливерио[1#], Дж.С.О. Бельтран[1,2#], Л. Оккигросси[1], В. Бордони[3], К. Аграти[3], М. Д'Элетто[1], Ф. Россин[1], П. Борелли[2], Г.П. Амаранте-Мендес[4], О. Демидов[5], Н.А. Барлев[5], М. Пьячентини[1,3,5*]

[1] *Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", 00133 Rome, Italy; E-mail: mauro.piacentini@uniroma2.it*

[2] *Clinical and Experimental Hematology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

[3] *National Institute for Infectious Diseases I.R.C.C.S. "Lazzaro Spallanzani" 00149 Rome, Italy*

[4] *Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

[5] *Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, 194064 St. Petersburg, Russia*

Поступила в редакцию 09.07.2020
После доработки 21.07.2020
Принята к публикации 21.07.2020

Трансглутаминаза 2-го типа (TG2) – мультифункциональный белок, участвующий в различных биологических процессах, направленных на поддержание клеточного гомеостаза, таких как клеточная гибель и аутофагия. Сейчас появляется все больше исследований, подтверждающих важную роль аутофагии в регуляции гемопоэза. Основываясь на этом, мы решили изучить *in vivo* роль TG2 в гемопоэзе при нормальных условиях и в условиях недостатка питательных веществ. Мы обнаружили, что у мышей, нокаутных по TG2, наблюдается уменьшение числа и скорости дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. В данной работе мы показали, что, вероятнее всего, подобные эффекты на кроветворную систему обусловлены TG2-зависимыми нарушениями аутофагии. Более того, активация аутофагии при голодании предотвращала остановку дифференцировки гемопоэтических предшественников у TG2-нокаутных мышей. Также мы показали, что в отсутствие TG2 значительно нарушена активация RhoA/ERK1/2 пути, который необходим для регуляции гомеостаза гемопоэтических предшественников в красном костном мозге. Таким образом, наше исследование расширило знания о TG2, обнаружив новую роль этого фермента в регуляции гемопоэза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансглутаминаза 2-го типа, гемопоэтические стволовые клетки, аутофагия.

DOI: 10.31857/S0320972520100048

ВВЕДЕНИЕ

Начало кроветворной системы дают гемопоэтические стволовые клетки (HSC). Ключевым свойством HSC является их способность к самообновлению, что обеспечивает поддержание популяции недифференцированных клеток, способных созревать в различные типы кровяных клеток, необходимых в данный момент организму [1]. HSC представляют собой гетерогенную популяцию, которую можно разделить на долгоживущие (LT, Long-Termed) и короткоживущие (ST, Short-Termed) HSC в зависимости от их потенциала к самообновлению [2]. LT-HSC составляют лишь ~0,05% от клеток красного костного мозга (BM) взрослой мыши, однако они способны обеспечивать гемопоэз на протяжении всего времени жизни организма [3]. Напротив, ST-HSC представлены в большем количестве в BM, но имеют ограниченную способность к самообновлению [3]. HSC дифференцируются в мультипотентные клетки-предшественники (MPP, multipotent progenitors), которые теряют способность к самообновлению, но способны к пролиферации и дальнейшей дифференцировке [4–6]. MPP дают начало клонально ограниченным предшественникам: клеткам-предшествен-

Принятые сокращения: BM – костный мозг; CFU – колониеобразующие единицы; HSC – гемопоэтические стволовые клетки; LT-HSC и ST-HSC – долгоживущие (LT, Long-Termed) и короткоживущие (Short-Termed) HSC; KO – мыши, нокаутные по TG2; LK – Lin^- c-Kit^+ гемопоэтические клетки, обогащенные миелоидными и мегакариоцитарно-эритроидными предшественниками; LSK – Lin^- c-Kit^+ Sca-1^+ гемопоэтические клетки, содержащие LT-HSC, ST-HSC и MPP; MPP – мультипотентные клетки-предшественники; PHSC – предшественники HSC; TG2 – трансглутаминаза 2-го типа; WT – мыши дикого типа.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

никам миелопоэза и клеткам-предшественникам лимфоцитопоэза [7–9]. HSC совместно с другими клетками и внеклеточным матриксом формируют «нишу» HSC [10, 11], где через межклеточные взаимодействия и секрецию хемокинов и цитокинов [12, 13] осуществляется регуляция HSC [12, 14–17]. «Ниши» HSC очень чувствительны к стрессу [18], инфекциям и воспалительным процессам [19].

Аутофагия – высококонсервативный катаболический процесс деградации внутриклеточных элементов в лизосомах, направленный на поддержание клеточного гомеостаза [20, 21]. Аутофагия участвует в поддержании жизнеспособности HSC, защищая их от метаболического стресса [22–24]. После лишения HSC стимуляции цитокинами *ex vivo* или при голодании *in vivo* в них значительно повышался уровень аутофагии, чего не наблюдалось у их короткоживущих миелоидных потомков [25]. С этим согласуются и другие данные, показывающие снижение уровня аутофагии в целом по мере возрастания уровня дифференцировки клеток [25, 26]. В физиологических условиях взрослые HSC находятся в «спящем», гликолитическом состоянии до тех пор, пока они не будут призваны восполнить запасы кровяных клеток [27]. Высокий уровень аутофагии/митофагии представляется крайне важным для покоящихся клеток, так как избавляет их от поврежденных митохондрий и активных форм кислорода (АФК) [28]. Нарушения в процессе аутофагии вызывают накопление митохондрий и переход HSC в активированное метаболическое состояние, что провоцирует их дифференцировку в миелоидные клетки через эпигенетическую регуляцию [29]. Делеция генов *Atg5* и *Atg7* вызывает снижение количества HSC и нарушение поддержания их гомеостаза [21, 26], что ассоциировано с повышенной продукцией АФК, индукцией апоптоза [30] и в итоге ведет к недостаточности костного мозга [21, 26]. Мы продемонстрировали, что трансглутаминаза 2-го типа (TG2, transglutaminase type 2) играет важную роль в созревании и деградации аутофагосом как в нормальном, так и в стрессовом состояниях [31–33]. Аналогичную роль TG2 играет в митофагии [34] и регуляции метаболизма митохондрий [35]. TG2 – уникальный, повсеместно распространенный многофункциональный член семейства трансглутаминаз, способный катализировать Ca^{2+}-зависимые посттрансляционные модификации белков, такие как межмолекулярные сшивки, аминирование белков и дезаминирование глутамина [36]. Также TG2 может проявлять ГТФазную, АТФазную, протеинкиназную и протеин дисульфид-изомеразную активности [37–42]. Благодаря своей широкой функциональности TG2 вовлечена во многие патофизиологические процессы [37, 43, 44].

Сведения о том, что ряд внутриклеточных процессов, модулирующих гомеостаз HSC, также регулируется TG2, побудили нас исследовать роль этого фермента в поддержании гомеостаза стволовых клеток. Для этой цели мы проанализировали состав HSC популяций, полученных из BM мышей дикого типа (WT), и мышей, нокаутных по TG2 (KO) в нормальных условиях и при недостатке питательных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах использовались мыши-самцы инбредные C57BL/6, дикого типа (WT) и нокаутные по ТГ2 (KO), возраст 2–3 месяца [45]. Всех животных содержали в свободных от патогенов условиях в виварии University of Rome «Tor Vergata» (Италия) с естественным циклом освещения при 20 °C и свободным доступом к воде и пище. Для эксперимента с активацией аутофагии часть мышей имели свободный доступ к пище, а часть была подвержена голоданию в течение 24 ч.

Клетки костного мозга. Клетки костного мозга (BM) были получены путем промывания медуллярной полости бедренной и большеберцовой кости культуральной средой Iscove («Sigma® Chemical Company», США) содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки после отрезания эпифиза. Клетки центрифугировали при 1500 rpm в течение 5 мин при 4 °C, фракцию красных кровяных телец лизировали на льду с 0,2% NaCl в течение 20 с, затем с 1,6% NaCl в течение 20 с, затем промывали с PBS («Gibco», США) и считали количество клеток при помощи гемоцитометра.

Оценка колониеобразующих единиц (CFU). Для оценки функциональности популяции HSC, изолированных из мышей WT и KO, был выполнен анализ колониеобразующих единиц (CFU). Для каждой мыши ($n = 3$ самца в каждой группе) клетки BM рассаживали в количестве 10 000 клеток на чашки Петри (диаметр 35 мм) и культивировали в среде, содержащей метилцеллюлозу (MethoCult™ GF M3434, «StemCell Technologies», Канада) [46]. MethoCult™ GF M3434 – специальная среда, предназначенная для поддержания оптимального роста и дифференцировки эритроидных клеток-предшественников (CFU-E, BFU-E), гранулоцитарно-макрофагальных клеток предшественников (CFU-GM, CFU-G, CFU-M) и промиелобластов (CFU-GEMM). Культуры клеток инкубировали

при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 в течение 2 и 12 дней, после чего чашки наблюдали под микроскопом, идентифицировали и подсчитывали образовавшиеся колонии. За колонии считали группы клеток $\geq$30 штук.

Цитометрическое определение HSC и предшественников HSC (PHSC). Для отличия HSC от других клеток костного мозга была проведена проточная цитометрия с комбинацией окрашивания маркеров клеточной поверхности [47]. Каноническая клеточная стратегия, используемая для анализа популяции HSC, включает в себя первую элиминацию дифференцированных клеток с использованием маркеров, идентифицирующих дифференцированные клетки крови, так называемый lineage cocktail с антителами против примерно восьми маркеров дифференцировки, называемых Lin-селекцией, в сочетании с положительным отбором для маркера, который, как известно, экспрессируется на HSC, таких как Kit1 (K) и Sca-1 (S). Среди гемопоэтических клеток было проведено разделение на Lin^- c-Kit^+ (LK), обогащенные миелоидными предшественниками и мегакариоцитарно-эритроидными предшественниками, и Lin^- c-Kit^+ Sca-1^+ (LSK), содержащие долгосрочные HSC, краткосрочные HSC и мультипотентные предшественники MPP [5, 48]. Для обнаружения HSC и PHSC все клетки BM были помечены антителами, как описано Ema et al. [49]. Все антитела были приобретены у компании «BD Biosciences», США за исключением Lin^- («Biotin-antibody cocktail», США) и вторичного антитела anti-Biotin («Miltenyi Biotec®», США). 3×10^6 клеток BM (для каждого образца) сначала инкубировали с Biotin-antibodies cocktail (Lin): (anti CD-5; Ter-119; Gr-1 (Ly-6G/C); CD45R (B220); $CD11b^+$) 10 мин при 4 °C, промывали PBS и затем инкубировали еще 10 мин в присутствии anti-biotin-PE, Sca-1 PE-Cy™7 и cKit PerCP-CyTM 5.5. Чтобы отличить LT-HSC, ST-HSC и MPP (PHSC) клетки, были также добавлены антитела CD90.1 (Thy-1.1)-APCy-7 и Flt3/Flk-2 лиганд AP, с которыми инкубировали 15 мин при 4 °C. Для анализа мы использовали FACS CANTO II (4 laser, «Becton-Dickson», США). Для проверки результата был использован способ Fluorescent Minus One (FMO). Было получено 3×10^6 событий для каждого образца и 1×10^5 событий для FMO контролей. Данные были обработаны в программе FlowJo v.10Æ.

Иммуноблоттинг популяции клеток BM. Экспрессия белков TG2, ERK, pMEK, p21, p27 и p53 была проанализирована во всей популяции клеток BM. Клетки BM, изолированные из мышей WT и KO, промывали 3 раза в PBS (pH 7,4) и лизировали с буфером Ripa («Pierce Biotechnology Inc.», США), содержащим смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma-Aldrich Corp.», США). Количество белка в полученных лизатах определяли по методу Брэдфорда с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. В каждую лунку наносили по 30 мкг белка в буфере Laemmli, разделение проводили в 10–12,5% SDS-полиакриламидном геле, после чего проводили перенос на нитроцеллюлозную мембрану («Millipore Corporation», США) в системе мокрого переноса («Bio-Rad Laboratories Inc.», США). Мембраны инкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока в T-PBS (PBS + 0,05% (*v/v*) Tween 20) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами в разведении 1/1000 («Cell Signaling Technology», США) в течение ночи. На следующий день мембраны трижды промывали с T-PBS, после чего инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad Laboratories Inc.», США, разбавление 1/5000), в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратной отмывки с T-PBS в течение 10 мин мембраны промывали с помощью реагентов ECL kit («Amersham ECL Western ™Advance Blotting Detection», США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе «Amersham ECL Western ™Advance Blotting Detection», США. Результаты нормировали по интенсивности хемилюминесценции β-актина (1/40 000 анти-β-актин, «Cell Signaling Technology», США) и выражали в произвольных единицах.

Статистический анализ. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Данные были проверены на нормальность, достоверность различий проверяли *t*-тестом Стьюдента и однофакторным дисперсионным тестом (1 way Anova). Значение $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. Анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism версии 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие TG2 влияет на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток. Нокаутные по TG2 мыши, в целом, жизнеспособны и фенотипически нормальны, но в зрелом возрасте в условиях стресса демонстрируют ряд дефектов, таких как умеренная непереносимость глюкозы, нарушение фагоцитоза апоптотических клеток [50, 51] и аутофагии [32, 52]. Чтобы изучить влияет ли отсутствие TG2 на HSC и/или предшественники гемопоэтических стволовых клеток (PHSCs/MPP), мы выделили и охарактеризова-

ли клетки костного мозга от мышей WT и KO (рис. S в Приложении).

Как и ожидалось, белок TG2 полностью отсутствует в клетках BM мышей KO (рис. 1, *a*). Примечательно, что измерение общего числа клеток в костном мозге показало, что мыши KO демонстрируют заметное снижение клеточности по сравнению с мышами WT (рис. 1, *b*). Эти данные побудили нас проанализировать, повлияло ли уменьшение количества клеток BM на популяцию HSC. Клетки BM, изолированные из мышей WT и KO, были помечены антителами Lin cocktail (CD-5; Ter-119; Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220), $CD11b^{+}$), Sca-1, c-Kit и проанализированы методом проточной цитометрии (рис. 1, *c*). Мы обнаружили значительное увеличение популяции LSK мышей KO по сравнению с WT (рис. 1, *d*). LSK популяция включает в себя HSC, но она по-прежнему неоднородна и содержит MPP, LT-HSC и ST-HSC. Для определения относительного количества этих клеток внутри LSK популяции были использованы антитела CD90.1 (Thy-1.1) и Flt3/Flk-2 лиганд – для характеристики клеток LT-HSC, ST-HSC и MPP (рис. 1, *c*). Результаты показали, что хотя популяция LT-HSC увеличивается у мышей KO по отношению к мышам WT (рис. 1, *e*), ST-HSC (рис. 1, *f*) и MPP (рис. 1, *g*), клетки показывают противоположное поведение. Очевидное уменьшение этих абсолютных чисел может свидетельствовать о возможном нарушении их клеточной дифференцировки.

Далее мы проанализировали способность HSC к пролиферации и дифференцировке *in vitro* с помощью анализа колониеобразующих единиц (CFU), используя среду Methocult (GF M3434) (см. Материалы и методы) (рис. 2, *a*). После 48 ч культивирования клеток мы наблюдали изменения роста эритроидных предшественников с заметным уменьшением числа больших взрывообразующих единиц (BFU-E), содержащих ранние клетки-предшественники, и более дифференцированные миеломонобласты (CFU-E), которые формируют меньшие колонии у мышей KO (рис. 2, *b*). В то время как после 12 дней культивирования мы наблюдали значительное уменьшение числа CFU-G колоний, содержащих гранулоциты. Для остальных типов колоний существенной разницы не было (рис. 1, *c*). Эти данные указывают на то, что TG2 может влиять на процесс дифференцировки от предшественника GM к зрелым гранулоцитарным клеткам.

Эти данные указывают на то, что экспрессия TG2 участвует в дифференцировочной способности LT-HSC по отношению к красным и белым кровяным клеткам.

Влияние отсутствия TG2 на экспрессию генов в клетках BM. Чтобы понять молекулярные механизмы, ответственные за наблюдаемые различия в количестве LSK клеток между мышами KO и WT, мы проанализировали возможные изменения в регуляции баланса покой/пролиферация. Было показано, что в процессе гемопоэза в HSC активируются пути MEK/ERK и PI3K, а фосфорилирование MEK1 активированным ERK противодействует активации AKT/mTORC [53]. В соответствии с этим выводом мы провели вестерн-блот анализ всей популяции клеток BM для выявления уровня активации белков MEK/Erk1/2, участвующих в поддержании покоя HSC [53, 54]. Интересно, что у мышей KO наблюдалась постоянная активация MEK/Erk1/2 пути, что выражалось в повышенном уровне фосфорилирования белков MEK1/2 и ERK1/2 (рис. 3, *a*). Также есть сведения о том, что TG2 необходима для активации ERK1/2, JNK1 и p38gamma MAP киназ через посттрансляционные модификации RhoA во время нейронной дифференцировки, индуцированной ретиноевой кислотой [55]. Вдобавок к этому, RhoA играет важную роль в регуляции клеточного цикла HSC за счет влияния на микроокружение [56]. Чтобы подтвердить связь между экспрессией TG2 и влиянием RhoA на HSC в BM, мы детектировали их экспрессию у мышей KO и WT.

Данные, представленные на рис. 3, *a*, демонстрируют, что уровень RhoA значительно увеличен у мышей KO. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что влияние TG2 на RhoA/ERK1/2/Map киназный сигнальный путь может быть компенсаторным физиологическим механизмом. Мы также измерили уровни p53, p21 и p27, чтобы посмотреть может ли отсутствие TG2 сказываться на регуляции клеточного цикла. Однако мы не обнаружили существенных изменений в уровне этих белков (рис. 3, *b*), таким образом предполагая, что отсутствие TG2 не влияет на пролиферацию клеток BM.

Влияние отсутствия TG2 на гемопоэтические клетки в условиях дефицита питательных веществ. Учитывая тот факт, что TG2 вовлечен в регуляцию аутофагии и контроль TG2 имеет отношение к гомеостазу HSC в BM, мы решили проверить может ли недостаток питательных веществ влиять на дифференцировку HSC. Для этой цели мы проанализировали модуляцию клеток BM у мышей WT и TG2 KO, которых кормили нормально или не давали еды в течение 24 ч. Интересно, что снижение количества клеток BM, наблюдаемое в отсутствие TG2, может быть значительно уменьшено голоданием (рис. 4, *a*). В то время как у мышей WT не было обнаружено никакого влияния голодания на ко-

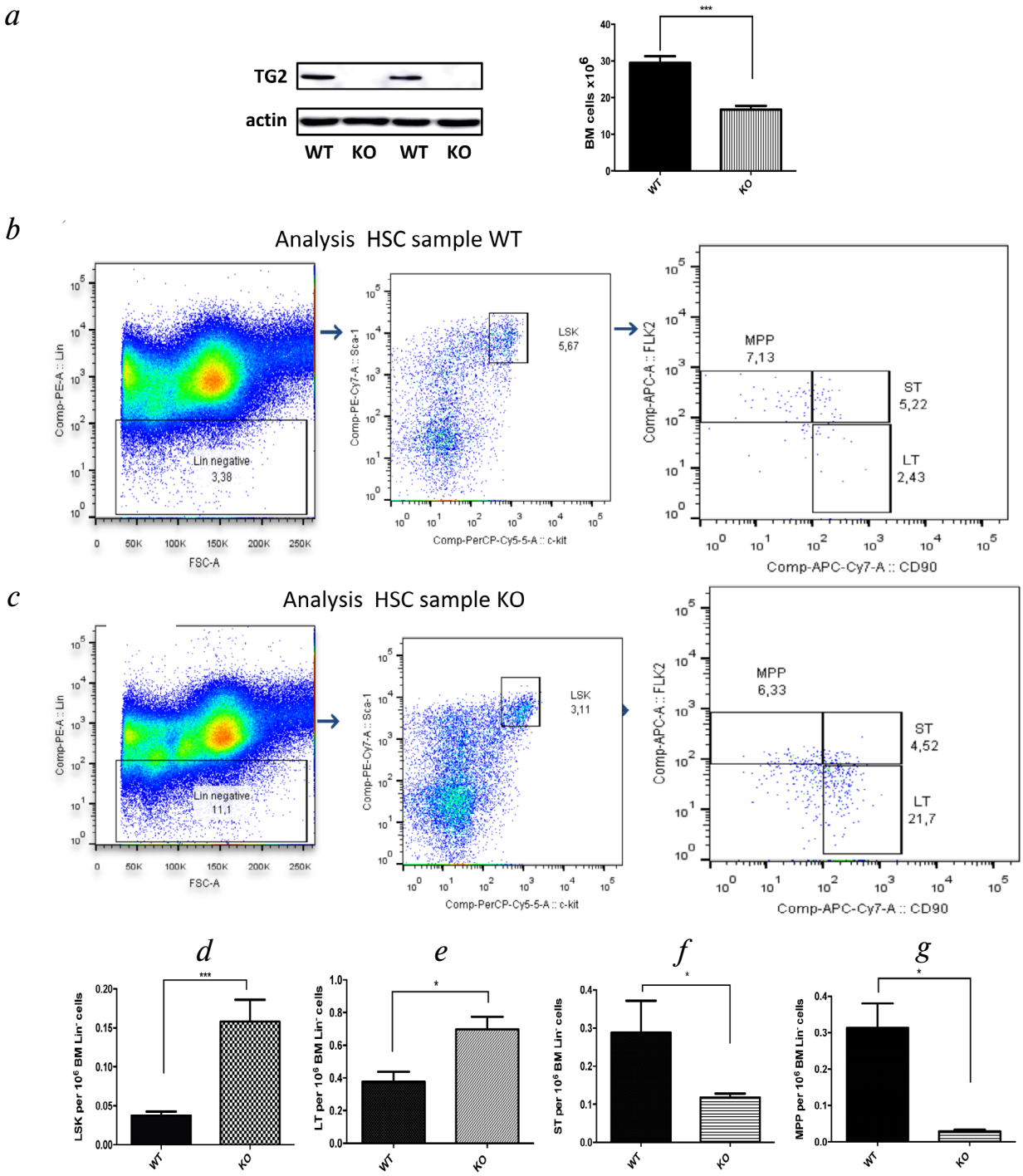


Рис. 1. Отсутствие TG2 изменяет популяцию HSC, полученную из BM взрослых мышей. *a* – Иммуноблоттинг TG2 клеток BM, полученных из $n = 2$ WT и $n = 2$ TG2 KO мышей. В качестве контроля нагрузки использовался актин. *b* – Общее число клеток костного мозга мышей WT и KO. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение, $^{***}p < 0{,}01$ ($n = 6$ самцов в каждой группе). *c* – Схема FACS анализа для иммунофенотипирования HSC и клеток-предшественников (как описано Pronk et al. [48]). С помощью описанного метода были фенотипированы LSK (lin negative Sca-1$^+$ cKit$^+$), LT (LSK, CD90$^+$ Flk2$^-$), ST (LSK CD90$^+$ Flk2$^+$), MPP (LSK CD90$^-$ Flk2$^+$), Lin: (CD-5; Ter-119; Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220) и CD11b). Данные для анализа 3×10^5 событий для каждого образца и 1×10^5 событий для контроля FMO были получены с помощью FACS CANTO II. Результаты были проанализированы на программе FlowJo v.10â, были определены проценты каждой популяции по отношению к клеткам BM. Эти % величины были использованы для расчёта абсолютного числа клеток в каждой популяции с использованием количества анализируемых клеток костного мозга. *d–g* – Абсолютные числа LSK, LT, ST, MPP клеток соответственно $\times 10^6$ Lin$^-$ клеток. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение, $^*p < 0{,}05$; $^{***}p < 0{,}001$ ($n = 6$ самцов в каждой группе). (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

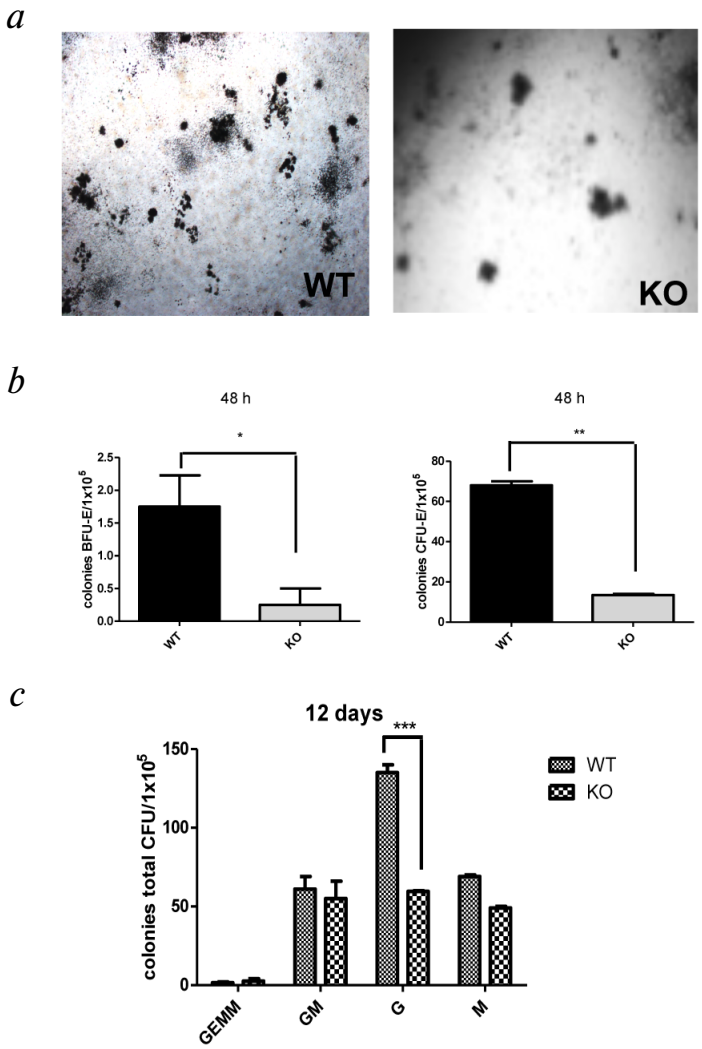


Рис. 2. Изменение колониеобразующей способности клеток BM мышей, и определение типа колоний. *a* – Фотографии колониеобразующих единиц у WT и KO мышей после 12 дней культивирования в специальной среде, содержащей миелоидные и эритроидные факторы роста (см. «Материалы и методы»). *b* – Численность колоний BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) и CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) клеток, образовавшихся из HSC костного мозга после 48 ч methocult анализа. *c* – Количество незрелых популяций BM у мышей WT и KO через 12 дней после выделения и культивирования в среде methocult. GEEM – гранулоциты, эритроциты, макрофаги и мегакариоциты, GM – гранулоциты и макрофаги, G – гранулоциты и M – макрофаги. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ ($n = 3$ самца в каждой группе)

личество клеток BM. Восполнение количества клеток BM у мышей KO совпадает со значительным уменьшением числа LSK клеток (рис. 4, *b*) с последующим увеличением популяций ST и MPP (рис. 4, *d*–*e*). Полученные данные говорят о том, что недостаток питательных веществ индуцирует дифференцировку HSC в BM, на что отсутствие TG2 влияет негативно.

Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие TG2 ослабляет процесс аутофагии в предшественниках BM HSC, тем самым приводя к уменьшению количества стволовых клеток и нарушению статуса их дифференцировки. Наши результаты показали, что, вероятнее всего, эти эффекты обусловлены TG2-зависимой дисрегуляцией аутофагии. И действительно, индукция аутофагии при голодании снимает блок на дифференцировку на уровне предшественников LT-HSC, как наблюдалось у мышей KO. Дальнейшие исследования необходимы для детального определения молекулярного механизма, который активируется в отсутствие TG2 и ведет к нарушению гомеостаза HSC. Однако мы показали, что RhoA/ERK1/2 путь, необходимый для регуляции гомеостаза клеток-предшественников BM, значительно деактивирован в отсутствие TG2. Таким образом, в нашей работе мы показали

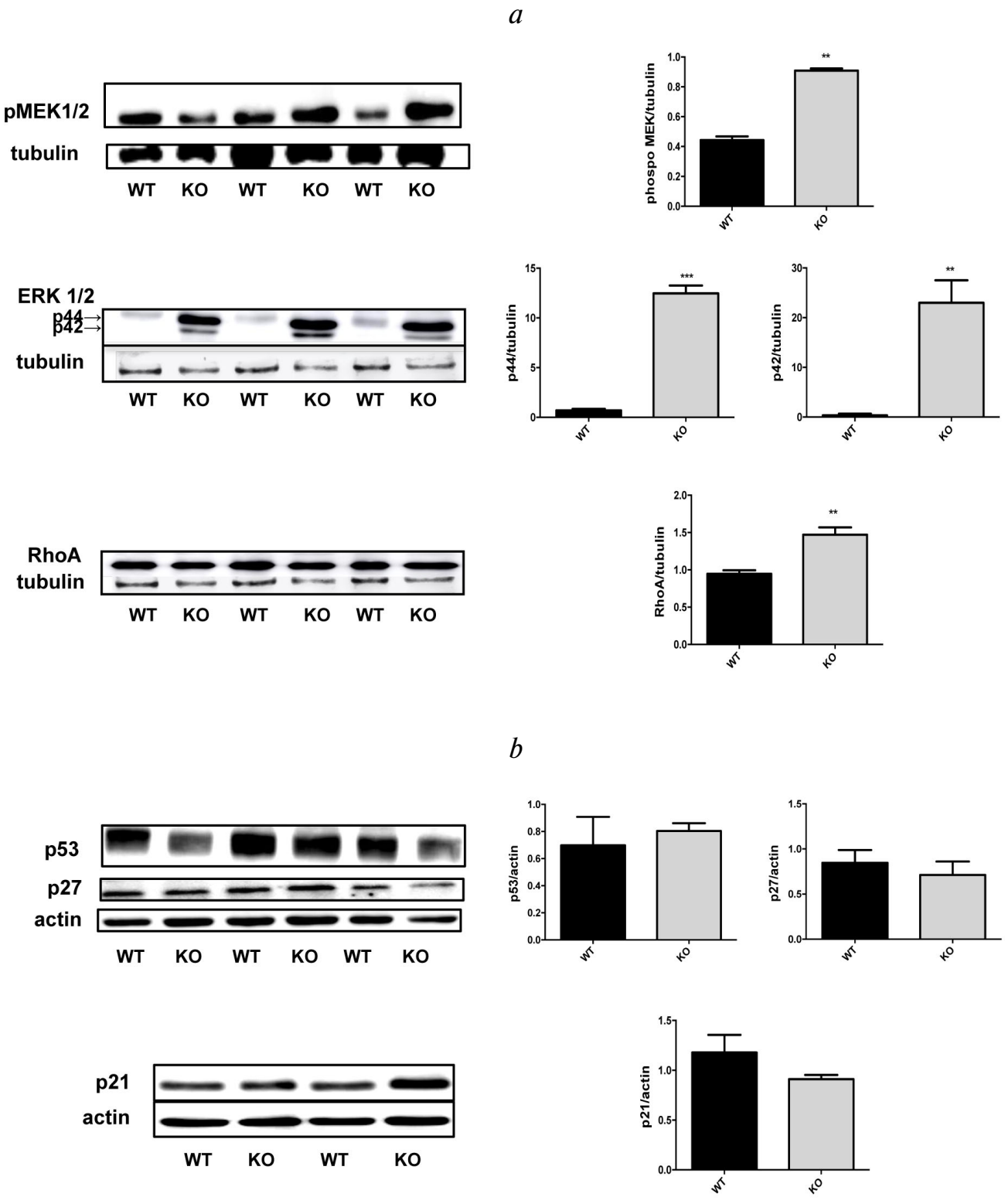


Рис. 3. Влияние отсутствия TG2 на экспрессию генов в клетках BM у мышей WT и KO. *a* – Влияние TG2 на RhoA/ERK1/2/Map сигнальный путь. Иммуноблоттинг для определения уровня активации пути MEK/ERK1/2 и для определения уровня белков RhoA у мышей WT и KO (*a* – левая сторона). Загрузку контролировали по тубулину. Денситометрия (*a* – правая сторона) – количественное определение фосфо-MEK, ERK1/2, p44, p42 и RhoA, нормализованных по тубулину ($n = 3$ самца в каждой группе). *b* – Влияние TG2 на клеточный цикл. Анализ уровня белков p53, p27 и p21 (*b* – левая сторона). Загрузку контролировали по актину. Денситометрия (*b* – правая сторона) – p53, p27 и p21 нормализованы по актину ($n = 3$ самца в каждой группе)

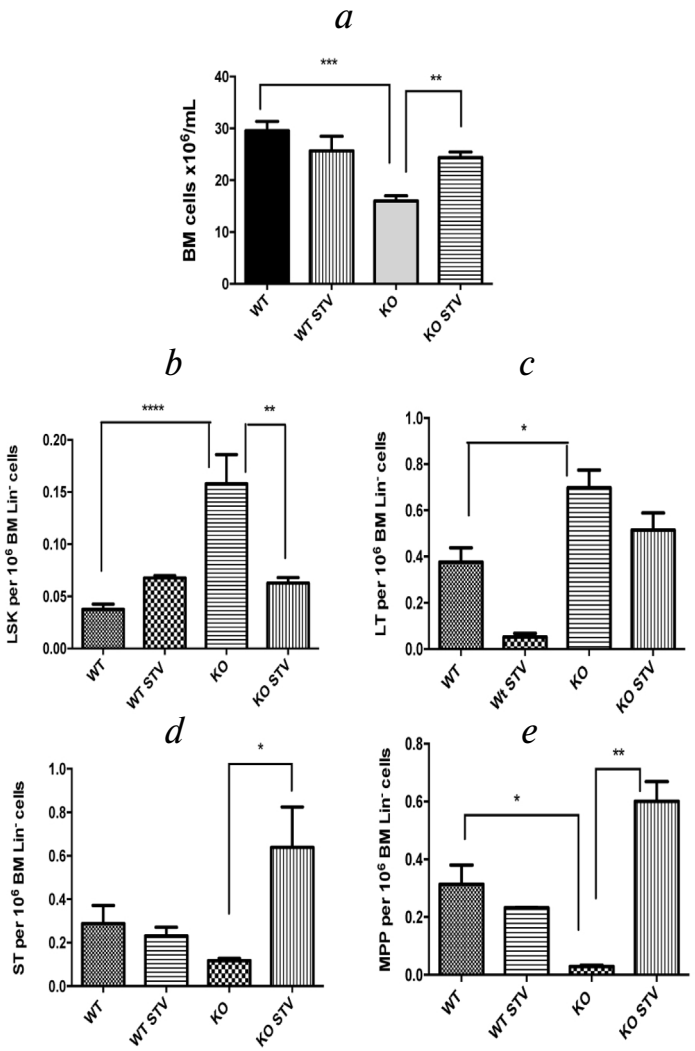


Рис. 4. Влияние недостатка питательных веществ на дифференцировку HSC. *a* – Общее число клеток BM у мышей WT и KO, нормально питающихся или голодающих 24 ч (STV). *b*–*e* – Абсолютное число LSK, LT, ST, MPP клеток × 10^6 BM Lin^- клеток у мышей WT и KO, нормально питающихся или голодающих 24 ч (STV). Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение, * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$ и *** $p < 0{,}001$ ($n = 3$ самца в каждой группе)

важную роль TG2 в регуляции и дифференцировке HSC.

Финансирование. Эта работа была частично поддержана AIRC (грант № IG2018-21880 M. П.), Итальянским Министерством Здравоохранения («Ricerca corrente and ricerca finalizzata», грант № RF2010 2305199), Regione Lazio (Gruppi di ricerca, грант № E56C18000460002, M. П.), Фондом Фиброза Cistica (грант № ФФК#10/2018 M. П.). Авторы также признают поддержку Российской Государственной Программы по привлечению ведущих ученых в российские высшие учебные заведения (грант № 14.W03. 31. 0029, M. П.). Ф. Р. поддержан «Фондом Umberto Veronesi» и AIRC стипендией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры в экспериментах на мышах выполнялись согласно стандартным руководящим принципам и этически утвержденным протоколам в соответствии с законодательным указом правительства Италии № 116 от 27 января 1992 г., меморандумом министра здравоохранения № 6 от 14 мая 2001 г. и утвержденными правовыми актами Российской Федерации и международных организаций.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 10, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orsini, M., Morceau, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2018) Autophagy as a pharmacological target in hematopoiesis and hematological disorders, *Biochem. Pharm.*, **152**, 347-361, doi: 10.1016/j.bcp.2018.04.007.
2. Ema, H., Morita, Y., and Suda, T. (2014) Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells, *Exp. Hematol.*, **42**, 72-82, doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.004.
3. Sharpless, N. E., and DePhino, R. A. (2007) How stem cells age and why this makes us grow old, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 703-713, doi: 10.1038/nrm2241.
4. Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rorby, E., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2011) Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78, *Cell Stem Cell*, **9**, 330-344, doi: 10.1016/j.stem.2011.07.016.
5. Challen, G. A., Boles, N., Lin, K. Y. K., and Goodell, M. A. (2009) Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis, *Cytometry*, **75**, 14-24, doi: 10.1002/cyto.a.20674.
6. Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 387-403, doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.387.
7. Seita, J., and Weissman, I. L. (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **2**, 640-653, doi: 10.1002/wsbm.86.
8. Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14541-14546, doi: 10.1073/pnas.261562798.
9. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages, *Nature*, **404**, 193-197, doi: 10.1038/35004599.
10. Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011) The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in, *J. Exp. Med.*, **208**, 421-428, doi: 10.1084/jem.20110132.
11. Ho, Y. H., and Méndez-Ferrer, S. (2020) Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging, *Haematologica*, **105**, 38-46, doi: 10.3324/haematol.2018.211334.
12. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches, *Immunity*, **25**, 977-988, doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
13. Guerrouahen, B. S., Al-Hijji, I., and Tabrizi, A. R. (2011) Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia, *Stem Cells Int.*, **2011**, doi: 10.4061/2011/375857.
14. Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y., and Suda, T. (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche, *Cell*, **118**, 149-161, doi: 10.1016/j.cell.2004.07.004.
15. Scadden, D. T. (2006) The stem-cell niche as an entity of action, *Nature*, **441**, 1075-1079, doi: 10.1038/nature04957.
16. Butler, J. M., Nolan, D. J., Vertes, E. L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A. T., Seandel, M., Shido, K., White, I. A., Kobayashi, M., Witte, L., May, C., Shawber, C., Kimura, Y., Kitajewski, J., Rosenwaks, Z., Bernstein, I. D., and Rafii, S. (2010) Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of notch-dependent hematopoietic stem cells, *Cell Stem Cell*, **6**, 251-264, doi: 10.1016/j.stem.2010.02.001.
17. Lèvesque, J. P., Helwani, F. M., and Winkler, I. G. (2010) The endosteal "osteoblastic" niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization, *Leukemia*, **24**, 1979-1992, doi: 10.1038/leu.2010.214.
18. Leveque, L., Le Texier, L., Lineburg, K. E., Hill, G. R., and Macdonald, K. P. (2015) Autophagy and haematopoietic stem cell transplantation, *Immunol. Cell Biol.*, **93**, 43-50, doi: 10.1038/icb.2014.95.
19. Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., and Wolf, D. H. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **349**, 275-280, doi: 10.1016/0014-5793(94)00672-5.
20. Liu, F., Lee, J. Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J. D., Morrison, S. J., and Guan, J. L. (2010) FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells, *Blood*, **116**, 4806-4814, doi: 10.1182/blood-2010-06-288589.
21. Mortensen, M., Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S. E., Kranc, K. R., and Simon, A. K. (2011) The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance, *J. Exp. Med.*, **208**, 455-467, doi: 10.1084/jem.20101145.
22. Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H. W. (2011) Autophagy in immunity and inflammation, *Nature*, **469**, 323-335, doi: 10.1038/nature09782.
23. Oh, J. E., and Lee, H. K. (2013) Autophagy as an innate immune modulator, *Immune Netw.*, **13**, 1-9, doi: 10.4110/in.2013.13.1.1.
24. Kim, S. J., Hong, E. H., Lee, B. R., Park, M. H., Kim, J. W., Pyun, A. R., Kim, Y. J., Chang, S. Y., Chin, Y. W., and Ko, H. J. (2012) α-Mangostin reduced ER stress-mediated tumor growth through autophagy activation, *Immune Netw.*, **12**, 253-260, doi: 10.4110/in.2012.12.6.253.
25. Warr, M. R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013) FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cell, *Nature*, **494**, 323-327, doi: 10.1038/nature11895.
26. Watson, A. S., Riffelmacher, T., Stranks, A., Williams, O., De Boer, J., et al. (2015) Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia, *Cell Death Discov.*, **1**, doi: 10.1038/cddiscovery.2015.8.
27. Kohli, L., and Passegué, E. (2014) Surviving change: the metabolic journey of hematopoietic stem cells, *Trends Cell Biol.*, **24**, 479-487, doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.001.
28. Riffelmacher, T., and Simon, A. K. (2017) Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation, *FEBS J.*, **284**, 1008-1020, doi: 10.1111/febs.13962.
29. Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., Figueroa, M. E., and Passegué, E. (2017) Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells, *Nature*, **543**, 205-210, doi: 10.1038/nature21388.
30. Gomez-Puerto, M. C., Folkerts, H., Wierenga, A. T. J., Schepers, K., Schuringa, J. J., Coffer, P. J., and Vellenga, E. (2016) Autophagy protein ATG5 and ATG7 are essential for the maintenance of human CD34(+) hematopoietic

stem-progenitor cells, *Stem Cells*, **34**, 1651-1663, doi: 10.1002/stem.2347.
31. D'Eletto, M., Farrace, M. G., Falasca, L., Reali, V., Oliverio, S., Melino, G., Griffin, M., Fimia, G. M., and Piacentini, M. (2009) Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation, *Autophagy*, **5**, 1145-1154, doi: 10.4161/auto.5.8.10040.
32. D'Eletto, M., Farrace, M. G., Rossin, F., Strappazzon, F., Di Giacomo, G., et al. (2012) Type 2 transglutaminase is involved in the autophagy-dependent clearance of ubiquitinated proteins, *Cell Death Differ.*, **19**, 1228-1238, doi: 10.1038/cdd.2012.2.
33. D'Eletto, M., Rossin, F., Fedorova, O., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (2019) Transglutaminase type 2 in the regulation of proteostasis, *Biol. Chem.*, **400**, 125-140, doi: 10.1515/hsz-2018-0217.
34. Rossin, F., D'Eletto, M., Falasca, L., Sepe, S., Cocco, S., Fimia, G. M., Campanella, M., Mastroberardino, P., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (2015) Transglutaminase 2 ablation leads to mitophagy impairment associated with a metabolic shift towards aerobic glycolysis, *Cell Death Differ.*, **22**, 408-418, doi: 10.1038/ cdd.2014.106.
35. Altuntas, S., D'Eletto, M., Rossin, F., Hidalgo, L. D., Farrace, M. G., Falasca, L., Piredda, L., Cocco, S., Mastroberardino, P. G., Piacentini, M., and Campanella, M. (2014) Type 2 Transglutaminase, mitochondria and Huntington's disease: menage a trois, *Mitochondrion*, **19**, 97-104, doi: 10.1016/j.mito.2014.09.008.
36. Piacentini, M., D'Eletto, M., Falasca, L., Farrace, M. G., and Rodolfo, C. (2011) Transglutaminase 2 at the crossroads between cell death and survival, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **78**, 197-246, doi: 10.1002/ 9781118105771.ch5.
37. Fesus, L., and Piacentini, M. (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 534-539, doi: 10.1016/s0968-0004(02)02182-5.
38. Gundemir, S., Colakb, G., Tucholskic, J., and Johnson, G. V. (2012) Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife, *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 406-419, doi: 10.1016/ j.bbamcr.2011.09.012.
39. Mishra, S., Melino, G., and Murphy, L. J. (2007) Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein, *J. Biol. Chem.*, **282**, 18108-18115, doi: 10.1074/jbc. M607413200.
40. Nurminskaya, M. V., and Belkin, A. M. (2012) Chapter one – cellular functions of tissue transglutaminase, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **294**, 1-97, doi: 10.1016/B978-0-12-394305-7.00001-X.
41. Belkin, A. M. (2011) Extracellular TG2: emerging functions and regulation, *FEBS J.*, **278**, 4704-4716, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x.
42. Mastroberardino, P. G., Farrace, M. G., Viti, I., Pavone, F., Fimia, G. M., Melino, G., Rodolfo, C., and Piacentini, M. (2006) "Tissue" transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1357-1365, doi: 10.1016/j.bbabio.2006.07.007.
43. Lorand, L., and Graham, R. M. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 140-156, doi: 10.1038/nrm1014.
44. Collighan, R. J., and Griffin, M. (2009) Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications, *Amino Acids*, **36**, 659-670, doi: 10.1007/s00726-008-0190-y.
45. De Laurenzi, V., and Melino, G. (2001) Gene disruption of tissue transglutaminase, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 148-155, doi: 10.1128/MCB.21.1.148-155.2001.
46. URL: https://www.stemcell.com. StemCell Technologies, Mouse Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult®. Technical Manual, Catalog #28405, Version 3.1. June 2005.
47. Mayle, A., Luo, M., Jeong, M., and Goodell, M. A. (2013) Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells, *Cytometry A*, **83**, 27-37, doi: 10.1002/ cyto.a.22093.
48. Pronk, C. J. H., Rossi, D. J., Mansson, R., Attema, J. L., Norddal, G. L., Fai Chan, C. K., Sygvardsson, M., Weissman, I. L., and Bryder, D. (2007) Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy, *Cell Stem Cell*, **1**, 428-442, doi: 10.1016/j.stem.2007.07.005.
49. Ema, H., Morita, Y., Yamazaki, S., Matsubara, A., Seita, J., Tadokoro, Y., Kondo, H., Takano, H., and Nakauchi, H. (2006) Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays, *Nature Protoc.*, **1**, 2979-2987, doi: 10.1038/nprot.2006.447.
50. Bernassola, F., Federici, M., Corazzari, M., Terrinoni, A., Hribal, M. L., De Laurenzi, V., Ranalli, M., Massa, O., Sesti, G., Irwin McLean, W. H., Citro, G., Barbetti, F., and Melino, G. (2002) Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient, *FASEB J.*, **16**, 1371-1378, doi: 10.1096/fj.01-0689com.
51. Szondy, Z., Sarang, Z., Molnard, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P. G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovacs, J., Kiss, I., Szegezdi, E., Lakos, G., Rajnavolgyi, E., Birckbichler, P. J., Melino, G., and Fesus, L. (2003) Transglutaminase $2^{-/-}$ mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7812-7817, doi: 10.1073/pnas.0832466100.
52. Rossin, F., D'Eletto, M., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (2014) Transglutaminase type 2: a multifunctional protein chaperone? *Mol. Cell. Oncol.*, **1**, e968506, doi: 10.4161/ 23723548.2014.968506.
53. Baumgaertner, C., Toifl, S., Farlik, M., Halbritter, F., Scheicher, R., Fischer, I., Sexl, V., Bock, C., and Baccarini, M. (2018) An ERK-dependent feedback mechanism prevents hematopoietic stem cell exhaustion, *Cell Stem Cell*, **22**, 879-892, doi: 10.1016/j.stem.2018.05.003.
54. Zarrabi, M., Afzal, E., Hossein Asghari, M., Monireh, M., Aboulkheyr, Es H., and Ebrahimi, M. (2018) Inhibition of MEK/ERK signalling pathway promotes erythroid differentiation and reduces HSCs engraftment in *ex vivo* expanded haematopoietic stem cells, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 1464-1474, doi: 10.1111/jcmm.13379.
55. Singh, U. S., Pan, J., Kao, Y. L., Joshi, S., Keri, L., Young, K. L., and Baker, K. M. (2003) Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 391-399, doi: 10.1074/jbc.M206361200.
56. Jaganathan, B. G., Afonso, F. A., Kumar, A., and Bonnet, D. (2013) Active RHO a favors retention of human hematopoietic stem/progenitor cells in their niche, *J. Biomed. Sci.*, **20**, 66, doi: 10.1186/1423-0127-20-66.

TRANSGLUTAMINASE TYPE 2 IS INVOLVED IN THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS HOMEOSTASIS

S. Oliverio[1#], J.S.O. Beltran[1,2#], L. Occhigrossi[1], V. Bordoni[3], C. Agrati[3], M. D'Eletto[1], F. Rossin[1], P. Borelli[2], G.P. Amarante-Mendes[4], O. Demidov[5], N.A. Barlev[5], and M. Piacentini[1,3,5*]

[1] *Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", 00133 Rome, Italy; E-mail: mauro.piacentini@uniroma2.it*

[2] *Clinical and Experimental Hematology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

[3] *National Institute for Infectious Diseases I.R.C.C.S. 'Lazzaro Spallanzani' 00149 Rome, Italy*

[4] *Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

[5] *Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, 194064 St. Petersburg, Russia*

Received July 9, 2020
Revised July 21, 2020
Accepted July 21, 2020

Type 2 transglutaminase (TG2) is a multifunctional protein involved in various biological processes playing a key regulatory role in cell homeostasis such as cell death and autophagy. New evidence is emerging that support an important role of autophagy in regulating normal hematopoiesis. Prompted by these findings, in this study we investigated *in vivo* involvement of TG2 in mouse hematopoiesis under normal or nutrient deprivation conditions. We found that the number and rate of differentiation of bone marrow hematopoietic stem cell was decreased in the TG2 knockout mice. We present evidence showing that these effects on hematopoietic system are very likely due to the TG2-dependent impairment of autophagy. In fact, stimulation of autophagy by starvation is able to rescue the block of the differentiation of stem cells progenitors in the TG2 KO mice. It was also show that the RhoA/ERK1/2 pathway, known to be essential for regulation of the bone marrow progenitor cells homeostasis, was significantly impaired in the absence of TG2. Hence, this study expanded our knowledge about TG2 discovering a role of this enzyme in regulation of hematopoiesis.

Keywords: TG2, hematopoietic stem cells, autophagy

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1372 – 1382

УДК 576.32.36

РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АУТОФАГИИ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2020 А.Ю. Ратушный*, Ю.В. Рудимова, Л.Б. Буравкова

Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, 123007 Москва, Россия; электронная почта: ratushkin@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2020
После доработки 05.08.2020
Принята к публикации 05.08.2020

Клеточное старение приводит к изменению ряда свойств мезенхимальных стромальных клеток (МСК), в том числе, увеличивается количество поврежденных структур, которые могут оказывать негативное влияние на внутриклеточные процессы. Устранение поврежденных молекул и органелл происходит посредством аутофагии, что может иметь большое значение в контексте старения. Одним из подходов к усилению терапевтических свойств и «замедлению» клеточного старения является использование для культивирования пониженного уровня кислорода. Цель данной работы заключалась в изучении некоторых морфофункциональных характеристик и экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, при репликативном старении МСК в условиях с различным содержанием кислорода. Проведенное исследование позволило выявить изменения в регуляции аутофагии на транскрипционном уровне. Показано повышение экспрессии генов роста аутофагосомной мембраны – *ATG9A*, *ULK1*, генов созревания аутофагосом – *CTSD*, *CLN3*, *GAA*, *GABARAPL1*, генов регуляции аутофагии – *TP53*, *TGFB1*, *BCL2L1*, *FADD*, *HTT*, при одновременном снижении экспрессии *IGF1* и *TGM2*. Отмечено увеличение объема лизосомального компартмента, что также указывает на усиление деградационной активности сенесцентных МСК. Использование при длительном культивировании пониженного содержания кислорода (5%) способствовало уменьшению количества лизосом. На транскрипционном уровне репликативное старение МСК в условиях различного содержания кислорода приводило к однотипным изменениям экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мезенхимальные стромальные клетки, репликативное старение, аутофагия, гипоксия.

DOI: 10.31857/S032097252010005X

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) задействованы в физиологическом обновлении тканей [1] и репарации раневых повреждений, поддерживая тканевой гомеостаз. МСК являются популяцией стволовых клеток взрослого организма, наиболее широко используемой в клинических испытаниях [2] в качестве инструмента регенеративной медицины. Регенеративный потенциал МСК обусловлен продукцией широкого спектра цитокинов, что определяет антиапоптотический, иммуномодуляторный, хемоаттрактивный, антифибротический и ангиогенный эффекты [3–6].

Активация клеточного старения (сенесценция), необходимого для предотвращения размножения клеток с поврежденным геномом, приводит к изменению морфофункциональных характеристик МСК и их регенеративных свойств. В значительной степени модифицируется цитокиновый профиль, что приводит к нарушению межклеточной коммуникации [7–9]. Клеточное старение характеризуется необратимым арестом клеточного цикла, а также включает ряд характерных признаков – дисфункция митохондрий, нарушение протеостаза, увеличение уровня активных форм кислорода, изменение экспрессии определенных генов и др. [7, 8].

Поскольку старение клетки тесно ассоциировано с увеличением доли поврежденных структур и изменением внутриклеточного гомеостаза, этот процесс взаимосвязан с аутофагией, необходимой для деградации нефункциональных органелл, белковых агрегатов и патогенных частиц. Активность аутофагии резко возрастает в ответ на стресс, что помогает клеткам адаптироваться к условиям окружающей среды. В то же время старение может приводить к снижению эффективности деградационных процессов [10, 11]. Исследования, посвященные взаимосвязи процессов аутофагии и старения, демонстрируют неоднозначные результаты. С одной стороны, аутофагия может проявлять просенесцентные эффекты через ассоциированный со старе-

* Адресат для корреспонденции.

нием секретом (SASP) [12]. Инициация старения с помощью высокой концентрации глюкозы, как и длительное культивирование МСК *in vitro*, приводит к увеличению экспрессии p16, p21, ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-Gal) и активации аутофагии. При этом ингибирование аутофагии отменяет проявление признаков старения клеток [13, 14]. С другой стороны, утилизация «неправильных» структур способствует замедлению старения. В гемопоэтических стволовых клетках [15], эмбриональных стволовых клетках [16] и мышечных сателлитных клетках [17] аутофагия может задерживать клеточное старение. Активация аутофагии необходима для пролиферации [18] и дифференцировки МСК [19], а её подавление может ограничивать терапевтический потенциал клеточного препарата [20]. Ассоциированные со старением белки могут ингибировать аутофагию и отменять ее защитные эффекты в фибробластах, проявляющих признаки старения, ускоряя этот процесс [21]. Следовательно, регуляторное влияние аутофагии на процесс старения может зависеть от исходного сенесцентного статуса клеток [22].

Потенциальное использование аутофагии для замедления клеточного старения МСК *in vitro* может быть интересно и в сочетании с другими подходами. В частности, ранее нами было показано, что использование физиологической гипоксии (5% O_2) для длительного культивирования позволяет снизить выраженность изменений маркеров, ассоциированных со старением. Эффект гипоксии при этом интенсивнее проявлялся на ранних пассажах (p2-5), чем на более поздних (p11-20) [23]. Предполагается, что изменение регуляции аутофагических процессов в зависимости от уровня оксигенации может быть одной из причин наблюдаемого эффекта. Цель данной работы заключалась в изучении некоторых морфофункциональных характеристик и экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, при репликативном старении МСК (p21-25) в условиях с различным содержанием кислорода (20% и 5%).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека с использованием стандартной методики [24] с модификациями [25] и культивировали в среде α-MEM (Gibco, США), содержащей 10%-ную фетальную телячью сыворотку («HyClone», США), 50 ед/мл пенициллина («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко») в условиях 5%-ной CO_2, 37°C, 100% влажности при 20% и 5% кислорода. Пересев осуществляли при 80–90% конфлюентности клеточного слоя. Для подтверждения иммунофенотипа МСК [26] исследовали экспрессию основных маркеров ($CD29^+$, $CD90^+$, $CD73^+$, $CD44^+$, $CD105^+$, $HLA\text{-}ABC^+$, $CD45^-$, $CD31^-$, $CD34^-$) с помощью соответствующих антител («Becton Dickinson», США) методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 («Becton Dickinson», США). Донорами были женщины 35–45 лет. Длительное культивирование продолжали до репликативного старения (21–25 пассаж).

Экспрессию β-галактозидазы (SA-β-gal) в клетках выявляли с помощью Senescence Cells Histochemical Staining Kit («Sigma-Aldrich», США) согласно инструкции производителя. Окрашивание проводили через семь дней после посева в стандартной плотности (3000 кл/см^2). Анализировали клетки с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU («Nikon», Япония).

Морфологию клеток оценивали с помощью светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU («Nikon»). Для количественной оценки относительного размера и гранулярности МСК использовали метод проточной цитофлуориметрии. Датчики регистрируют поглощение и рассеивание света клеткой (прямое (Forward Scatter – FSC-A) и угловое (Side Scatter – SSC-A)). FSC-A позволяет судить о размерах клетки, а SSC-A – о гранулярности цитоплазмы.

Жизнеспособность МСК определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 («Becton Dickinson») с использованием набора Annexin V-FITC/PI («Immunotech», Франция) согласно инструкции производителя. Annexin V позволяет выявлять апоптотические клетки, а PI метит клетки на поздних стадиях клеточной гибели.

Аутофлуоресценция и выявление лизосом. Аутофлуоресценцию анализировали при длине волны 530 нм. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре Accuri C6 («Becton Dickinson»). Для выявления лизосомальных включений использовали pH-зависимый маркер LysoTracker Green DND-26 («Life Technologies», США). Флуоресцентный зонд селективно накапливается в клеточных компартментах с низким внутренним pH в живых клетках. Возбуждение/эмиссия: 504/511 нм. Клетки с зондом (200 нМ) культивировали 30 мин при 37°C.

Количественная ПЦР. Для определения уровня экспрессии генов выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента QIAzol («Qiagen», США), после чего осуществляли ре-

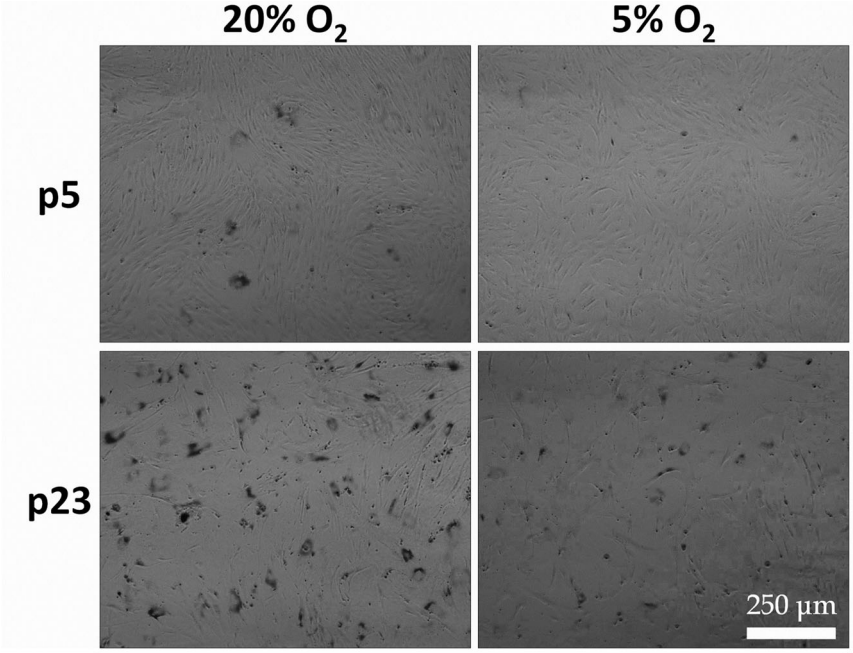
акцию обратной транскрипции с использованием QuantiTect Reverse Transcription Kit («Qiagen») согласно инструкциям производителя. Контроль концентрации и чистоты РНК в образцах осуществляли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-2000c («Thermo Scientific»). Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР с применением коммерческого реагента RT2 – Real Time SYBR Green/ROX PCR master mix («Qiagen», США) и планшетов Autophagy RT2 Profiler PCR Array («Qiagen») с иммобилизованными лиофилизированными праймерами. Измерения проводили на приборе Mx3000P («Stratagene», США). Уровень экспрессии оценивали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [27]. В качестве референсных генов использовали *ACTB, B2M, GAPDH, HPRT, RPLP0*, включенные в состав набора.

Статистическая обработка данных. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

МСК длительно культивировали до достижения лимита Хейфлика, используя физиологический (5%) и атмосферный (20%) уровни кислорода. Ранее нами было показано, что значительное снижение пролиферативной активности МСК происходит после 20-ого пассажа [9]. Исходя из этого, в клетках на ранних (p2-5) и поздних (p21-25) пассажах при культивировании в различных условиях оксигенации оценивали ряд морфофункциональных параметров (активность β-галактозидазы, ассоциированной со старением, жизнеспособность, морфология, аутофлуоресценция, лизосомальный компартмент) и транскрипционную активность 84 генов, ассоциированных с аутофагией.

Активность β-галактозидазы, ассоциированной со старением. Широко используемым в настоящее время маркером клеточного старения является активность ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-gal) [28]. Показано



Доля клеток с активной β-галактозидазой, %		
Пассажи	Уровень кислорода	
	20%	5%
p3-5	9,2 ± 4,3	3,5 ± 1,9*
p21-25	88,5 ± 9,6#	67,8 ± 12,3*#

Рис. 1. Выявление активной β-галактозидазы (SA-β-gal), ассоциированной со старением, в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Световая микроскопия. Данные представлены как M ± SD, $n \geq 5$, *,# $p \leq 0{,}05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O_2, # – сравнение с клетками p2-5)

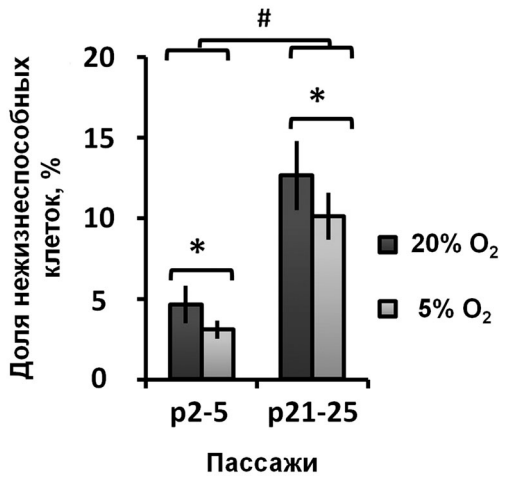


Рис. 2. Оценка жизнеспособности МСК при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, с применением окрашивания флуоресцентными красителями Ann V/PI. Данные представлены как M ± SD, $n \geq 5$, *,# $p \leq 0{,}05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O_2, # – сравнение с клетками p2-5)

значительное увеличение количества клеток с активной SA-β-gal на поздних пассажах (рис. 1), что подтверждает сенесцентное состояние МСК. При этом культуры, постоянно экспонируемые при 5% O_2, содержали меньше клеток, экспрессирующих SA-β-gal.

Жизнеспособность МСК. С помощью метода проточной цитофлуориметрии с применением окрашивания флуоресцентными красителями Annexin V / Propidium Iodide была проанализирована жизнеспособность МСК на ранних и поздних пассажах. Было показано, что на поздних пассажах обнаруживается повышение доли нежизнеспособных клеток в 2,5–3 раза (рис. 2). При культивировании МСК в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) доля нежизнеспособных клеток была снижена как на ранних пассажах, так и в сенесцентных культурах, т.е. при 5% O_2 жизнеспособность МСК повышается (рис. 2). Доля нежизнеспособных клеток включает как Ann^+/PI^-, так и Ann^+/PI^+ популяции. Во всех исследуемых образцах жизнеспособность оставалась выше 85%.

Морфология клеток. Еще одним феноменологическим признаком сенесцентного состояния, косвенно связанным с пролиферативной активностью, является изменение морфологии клеток. В наших экспериментах на ранних этапах культивирования МСК имели преимущественно веретеновидную форму. На поздних пассажах клетки характеризовались увеличением размера, более выраженной популяционной гетерогенностью и увеличением количества цитоплазматических включений (рис. 3).

Для количественного сравнения морфологических показателей МСК в суспензии использовали метод проточной цитофлуориметрии. Данная методика позволяет оценить показатели рассеянного света, которые обусловлены размером, формой, плотностью клеток и гранулярностью внутриклеточной структуры. Было показано, что на поздних пассажах увеличивался средний размер МСК и их гранулярность, оцен-

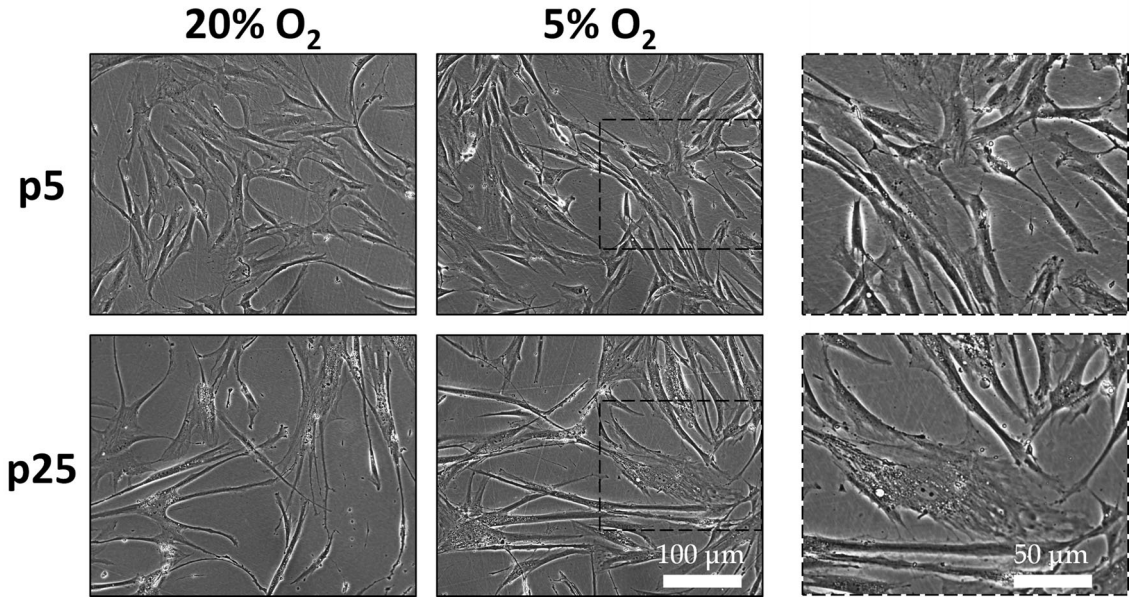


Рис. 3. Морфология МСК при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Световая микроскопия

Таблица 1. Оценка размера и гранулярности МСК по FSC-A и SSC-A, соответственно, при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, проточная цитометрия. Данные представлены как M ± SD, $n \geq 5$, *, # $p \leq 0,05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O_2, # – сравнение с клетками p3-5)

FSC-A (прямое светорассеяние), усл. ед. $\times 10^3$			SSC-A (боковое светорассеяние), усл. ед. $\times 10^3$		
Пассажи	Уровень кислорода		Пассажи	Уровень кислорода	
	20%	5%		20%	5%
p3-5	62,0 ± 3,7	57,2 ± 1,3*	p3-5	8,3 ± 1,2	7,2 ± 1,3
p21-25	74,5 ± 5,0#	75,8 ± 1,6#	p21-25	11,0 ± 2,2#	11,2 ± 2,1#

Таблица 2. Средняя интенсивность флуоресценции LysoTracker Green DND26 и аутофлуоресценции на длине волны 530 нм в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, проточная цитофлуориметрия. Данные представлены как M ± SD, $n \geq 5$, *,# $p \leq 0,05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O_2, # – сравнение с клетками p3-5)

LysoTracker Green DND26, усл. ед. $\times 10^3$			Аутофлуоресценция, усл. ед. $\times 10^3$		
Пассажи	Уровень кислорода		Пассажи	Уровень кислорода	
	20%	5%		20%	5%
p3-5	397,6 ± 44,1	292,6 ± 58,9*	p3-5	10 ± 0,5	8 ± 0,8*
p21-25	782,8 ± 75,8#	640,3 ± 78,1*,#	p21-25	15 ± 0,6#	14 ± 0,5#

ка которых осуществлялась по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию соответственно (табл. 1). При 5% O_2 средний размер клеток оказался сниженным на ранних пассажах. Значительных различий по морфологии клеток и гранулярности внутриклеточной структуры МСК в зависимости от уровня оксигенации на поздних пассажах не было выявлено.

Лизосомальный компартмент. Для исследования активности лизосомального компартмента был использован зонд LysoTracker Green DND-26, который селективно накапливается в везикулах с пониженным pH, главным образом – в лизосомах. В результате проведенных исследований было показано значительное повышение флуоресценции данного зонда в МСК на поздних пассажах. Культивирование клеток в условиях с физиологическим уровнем кислорода приводило к значимому снижению средней интенсивности флуоресценции (СИФ) зонда LysoTracker Green DND-26 как на ранних, так и на поздних пассажах (табл. 2). Постоянное ведение культуры МСК при 5% O_2 вызывало снижение флуоресценции LysoTracker Green DND-26 в 1,5–2 раза (табл. 2).

На поздних пассажах также было детектировано значительное увеличение аутофлуоресценции МСК, что связывают, в первую очередь, с накоплением липофусцина (табл. 2). На ранних пассажах отмечено снижение аутофлуоресценции при культивировании в условиях физиологической гипоксии.

Транскрипция генов аутофагии. Анализ результатов транскриптомной активности 84 генов, ассоциированных с аутофагическими процессами, в МСК ранних и поздних пассажей не выявил значимых различий в зависимости от уровня оксигенации (рис. 4). Тем не менее, длительное культивирование клеток приводило к значимому изменению экспрессии ряда генов. В сенесцентных клетках повышалась экспрессия *ATG9A*, *BCL2L1*, *CTSD*, *FADD*, *GAA*, *GABARAPL1*, *HTT*, *NPC1*, *TGFB1*, *TP53 (p53)*, *ULK1* и снижалась экспрессия *IGF1* и *TGM2* (рис. 4, 5). Данные гены можно условно разделить на три группы: гены регуляции аутофагии (*IGF1*, *TP53*, *TGFB1*, *BCL2L1*, *FADD*, *HTT*), гены инициации сборки аутофагосомы (*ATG9A*, *ULK1*) и гены созревания аутофагосомы (*TGM2*, *CTSD*, *CLN3*, *GAA*, *GABARAPL1*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используемая в работе модель репликативного старения МСК позволила получить клеточные

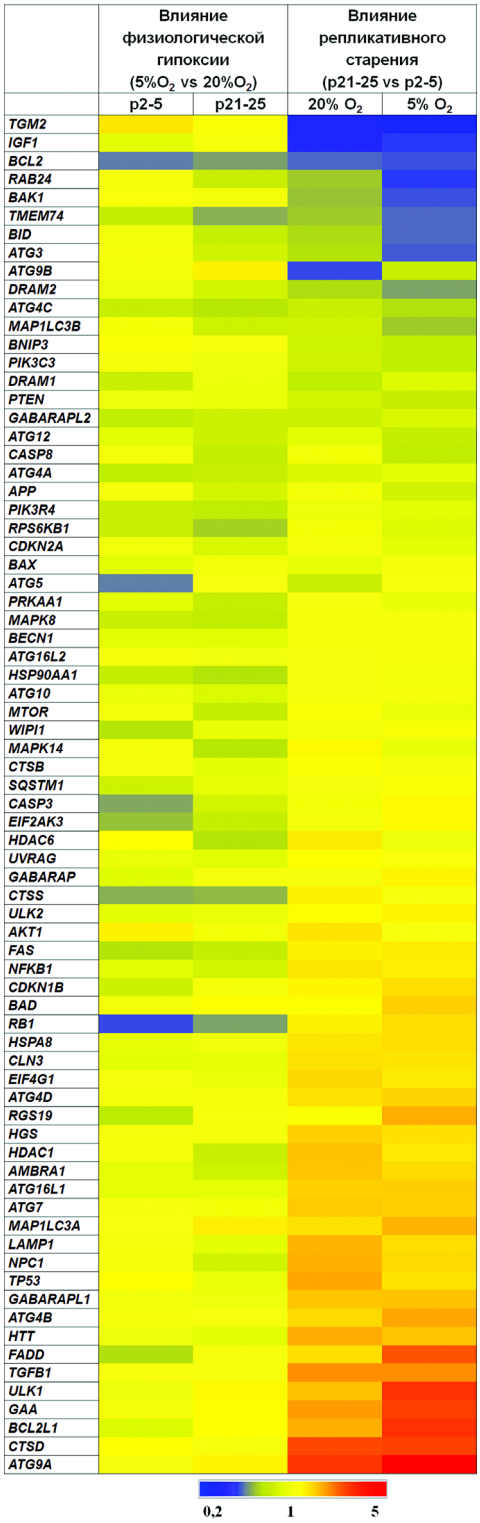


Рис. 4. Тепловая карта относительной экспрессии генов, ассоциированных с аутофагическими процессами. Рассматривается влияние физиологической гипоксии (5% O_2 vs 20% O_2) на ранних и поздних пассажах и влияние репликативного старения (p21-25 vs p2-5) при культивировании МСК в условиях различной оксигенации. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

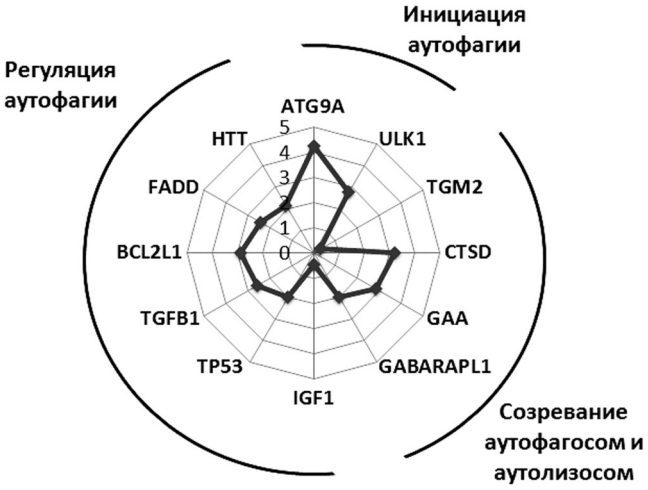


Рис. 5. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с аутофагическими процессами, в сенесцентных МСК относительно клеток на ранних пассажах. Представлены гены, экспрессия которых значимо изменилась ($p \leq 0,05$) более чем в 2 раза

культуры с характерными морфофункциональными модификациями, включая понижение жизнеспособности, увеличение размера, гранулярности, аутофлуоресценции и уровня флуоресценции LysoTracker Green DND-26. Несмотря на то, что сенесцентные клетки могут проявлять устойчивость к апоптозу [7, 29], некоторое снижение жизнеспособности при длительном культивировании является для них характерным признаком. При этом данные о влиянии пониженного содержания кислорода на процессы апоптоза в МСК противоречивы. Показано, что МСК, выделенные из костного мозга, сохраняют одинаковую жизнеспособность при постоянном культивировании в условиях 20% и 2–3% O_2 [30, 31]. Однако большинство исследователей сходятся во мнении, что физиологическая гипоксия повышает жизнеспособность МСК [32–34]. Клетки, культивируемые при атмосферном уровне кислорода, более подвержены повреждению ДНК, чем клетки, культивируемые при пониженной оксигенации. Исследователи предполагают связь данного эффекта с уровнем внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) [34, 35].

Снижение содержания кислорода в среде культивирования, вероятно, позволяет снизить скорость появления дефектных структур, возникающих вследствие оксидативных повреждений. Культивирование МСК при 5% O_2 вызывало снижение детектируемой флуоресценции LysoTracker Green DND-26. В этом случае общий объем кислых лизосомальных включений может косвенно указывать на количество поврежденных внутриклеточных структур. В настоящее

время считается, что старение приводит к снижению общей способности клеток к деградации и сопровождается общим снижением активности протеасом и лизосом [36]. При этом количество и размер лизосом у большинства клеток увеличивается с возрастом [37, 38]. В сенесцентных лизосомах наблюдается накопление неразлагаемого материала, который состоит из окисленных макромолекул, подвергнутых вторичным модификациям, что делает их менее восприимчивыми к действию кислых гидролаз. Эти посттрансляционные модификации включают перекисное окисление липидов и карбонилирование белков.

Основным примером является способный к аутофлуоресценции липофусцин, также известный как возрастной пигмент, который используется в качестве маркера старения [39]. В нашей работе показано значительное увеличение аутофлуоресценции МСК на поздних пассажах, что свидетельствует, в первую очередь, о накоплении липофусцина. Данный пигмент старения преимущественно накапливается внутри лизосом и его образование ускоряется реакциями Фентона, которые происходят внутри этих органелл в ответ на окислительный стресс. Вероятно, повышенное накопление липофусцина в лизосоме может изменить его деградационную функцию [40]. Стоит отметить, что органеллы с липофусцином при этом остаются кислыми, туда даже продолжают поступать гидролитические ферменты, хотя свои функции по расщеплению уже не выполняют. Нарушение работы лизосом ведет к накоплению «неправильных» белков и целых клеточных структур вроде дефектных митохондрий. Недостаточность аутофагии приводит к интенсификации процессов старения [40]. Таким образом, детектируемое увеличение флуоресценции зонда LysoTracker Green DND-26, аутофлуоресценции и повышение вакуолизации цитоплазмы может быть доказательством увеличения количества и размеров лизосомальных включений. Тем не менее, большинство из них, вероятно, не способны в полной мере выполнять утилизирующую функцию, а отсутствие клеточных делений не позволяет уменьшить их количество на клетку.

Отсутствие клеточных делений не приводит к остановке роста клетки, что и обуславливает увеличение среднего размера МСК на поздних пассажах. При этом сенесцентные клетки способны сохранять жизнеспособность и функциональную активность довольно долго, не запуская апоптотические каскады и продолжая увеличиваться в размерах и накапливать широкий спектр различных цитоплазматических включений [7, 29, 41]. Сходные данные об изменениях морфологии при клеточном старении были получены и в других исследованиях МСК, выделенных из жировой ткани [42]. Значимое снижение среднего размера клеток при физиологической гипоксии на ранних пассажах, вероятно, связано с повышенной пролиферативной активностью, что было продемонстрировано нами и другими авторами ранее [34, 43].

Необходимо отметить, что в работе была изучена экспрессия ряда генов, многие из которых участвуют не только в аутофагии, но и в широком спектре других внутриклеточных процессов. Обнаруженные изменения экспрессии указывают на активацию аутофагии. Важным является снижение уровня мРНК *IGF1* (Insulin-like growth factor 1). Известно, что ингибирование сигнального пути *IGF1* увеличивает продолжительность жизни, защищает от нейродегенерации и рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень [44]. Обнаружено, что пониженная экспрессия *IGF1* защищает сенесцентные МСК через активацию аутофагии, увеличивая, тем самым, выживаемость клеток после трансплантации в очаг инфаркта миокарда [45].

В клетках поздних пассажей было также обнаружено увеличение транскрипта *TP53* (tumor-protein p53), который в ядре осуществляет контроль генов, участвующих в отрицательной регуляции mTORC1 и запускающих аутофагию [46]. Y. Ma et al. показали, что аутофагия играет важную роль в поддержании МСК при старении и отметили, что аутофагический контроль может частично защитить от проявления возрастных признаков МСК посредством регуляции ROS-p53 [11]. В ряде работ продемонстрирована активация аутофагии, когда МСК входят в состояние репликативного старения [14]. Подавление p53 приводило к снижению преобразования LC3-I до LC3-II и увеличению экспрессии mTOR, показывая, что он представляет собой критический триггер для активации аутофагии в культивируемых МСК [47].

Еще одним фактором, способным активировать аутофагию, является трансформирующий фактор роста-β (*TGFB1*). TGF-β стимулирует синтез коллагена типа Iα2 и фибронектина в миофибробластах предсердий человека (hATMyofbs), и это сопровождается увеличением аутофагической активности. Ингибирование аутофагии или нокаут *ATG7* и *ATG5* снижало фиброзный эффект TGF-β1, что подтверждает тесную взаимосвязь процесса дифференцировки и аутофагии [48].

HTT (huntingtin), кодирующий белок гентинктин, который, по-видимому, играет несколько ролей в регулировании динамики аутофагии, также был более экспрессирован в сенесцентных МСК. Взаимодействуя с моторным белком

микротрубочек динеином, Htt участвует в транспортировке аутофагосом вдоль микротрубочек. Кроме того, показано, что Htt после посттрансляционной модификации может участвовать в регуляции аутофагии, так как присутствие в клетке укороченной формы Htt ассоциируется с повышением уровня LC3-II и сопровождается увеличением аутофагии [49].

В МСК при репликативном старении увеличивалась транскрипция гена *BCL2L1* (BCL2-like 1) антиапоптотического белка Bcl-xl. Участие этого белка показано не только в апоптотическом процессе, но и аутофагии [50]. Длительное культивирование МСК приводило к увеличению экспрессии гена *FADD* (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain). Кроме участия в апоптозе, *FADD* также играет роль в других процессах, включая пролиферацию клеток и регуляцию клеточного цикла. В эксперименте с нормальными эпителиальными клетками, экспрессирующими *FADD*, в ответ на провоспалительную активацию, было показано присутствие в цитоплазме многочисленных мембраносвязанных везикул, характерных для аутофагии, при этом детектировалась агрегация LC3 в ответ на FADD-DD, которая начиналась до проявления морфологических признаков гибели клеток [51].

Анализируя группу генов, относящихся к процессам инициации аутофагии, следует отметить повышенную транскрипцию генов *ATG9A* (ATG9 autophagy related 9 homolog A) и *ULK1* (Unc-51-like kinase 1) в культурах МСК 21–24 пассажа. В клетках млекопитающих Atg9a-содержащая везикула участвует в доставке к месту инициации или фагофору и контролируется комплексом ULK1/2, являющимся первым инициирующим сборку омегасомы событием [52].

Наряду с увеличенной экспрессией генов регуляции и инициации аутофагии, культивирование МСК до репликативного старения вызывало увеличение мРНК гена *CLN3* (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3), входящего в группу созревания аутофагосом. Подтверждено, что белок CLN3 присутствует в аутофагосомах и аутолизосомах, и потеря его функциональной активности тормозит созревание деградационных аутолизосом [53].

Длительное культивирование увеличивало транскрипцию *GABARAPL1* (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein - like 1), кодирующего убиквитин-подобный модификатор. Этот высококонсервативный белок участвует в образовании аутофагосомальных вакуолей на поздней стадии созревания. При сниженной продукции данного белка процессы аутофагии ослабевают, а количество лизосом уменьшается [54].

В стареющих МСК отмечался повышенный уровень мРНК генов лизосомальных ферментов, таких как *CTSD* (cathepsin D) и *GAA* (glucosidase, alpha; acid). Показано, что высокая экспрессия CatD в клетках HeLa значительно активировала аутофагию. Предполагают, что CatD может функционировать как антиапоптотический медиатор, вызывая аутофагию при клеточном стрессе [55].

Транскрипция гена фермента тканевой трансглутаминазы 2 (*TGM2)* в сенесцентных МСК была снижена. Известно, что этот фермент накапливается до высоких уровней в клетках в стрессовых условиях. Однако отмечается, что отсутствие экспрессии трансглутаминазы 2 как *in vivo*, так и *in vitro* приводит к накоплению LC3 II на преаутофагических везикулах, что указывает на заметную индукцию аутофагии [56].

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить изменения в регуляции аутофагии на транскрипционном уровне при репликативном старении МСК. Показана модификация экспрессии ряда генов, которая может указывать на усиление деградационной активности клетки. Отмечено увеличение объема лизосомального компартмента. Отсутствие пролиферации не позволяет уменьшить количество поврежденных и неразлагаемых структур путем их разделения между дочерними клетками. В этом случае активация транскрипционных механизмов, запускающих аутофагию, выглядит логичным шагом. Обнаружено изменение экспрессии генов, ассоциированных с ростом аутофагосомной мембраны, созреванием аутофагосом и регуляцией аутофагии. Однако в сенесцентных клетках рост количества поврежденных структур происходит быстрее, чем их деградация. Использование для культивирования физиологической гипоксии позволяло снизить количество лизосом, что может быть ассоциировано с уменьшением внутриклеточных повреждений. Тем не менее на транскрипционном уровне значительных модификаций обнаружено не было. Длительное культивирование МСК в условиях с различным содержанием кислорода приводит к однотипным изменениям экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-015-00150-А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chan, R. W. S., Schwab, K. E., and Gargett, C. E. (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells, *Biol. Reprod.*, **70**, 1738-1750, doi: 10.1095/biolreprod.103.024109.
2. Trounson, A., and McDonald, C. (2015) Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges, *Cell Stem Cell*, **17**, 11-22, doi: 10.1016/j.stem.2015.06.007.
3. Caplan, A. I. (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight, *J. Pathol.*, **217**, 318-324, doi: 10.1002/path.2469.
4. Hodgkinson, C. P., Bareja, A., Gomez, J. A., and Dzau, V. J. (2016) Emerging concepts in paracrine mechanisms in regenerative cardiovascular medicine and biology, *Circ. Res.*, **118,** 95-107, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305373.
5. Gornostaeva, A., Andreeva, E., and Buravkova, L. (2016) Factors governing the immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro*, *Cytotechnology*, **68**, 565-577, doi: 10.1007/s10616-015-9906-5.
6. Lunyak, V. V., Amaro-Ortiz, A., and Gaur, M. (2017) Mesenchymal stem cells secretory responses: senescence messaging secretome and immunomodulation perspective, *Front. Genet.*, **8**, 220-240, doi: 10.3389/fgene.2017.00220.
7. Turinetto, V., Vitale, E., and Giachino, C. (2016) Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1164, doi: 10.3390/ijms17071164.
8. Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., and Bao, J. (2017) Senescence of mesenchymal stem cells, *Int. J. Mol. Med.*, **39**, 775-782, doi: 10.3892/ijmm.2017.2912.
9. Ratushnyy, A., Ezdakova, M., and Buravkova, L. (2020) Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1802-1817, doi: 10.3390/ijms21051802.
10. Morgunova, G. V., Klebanov, A. A., and Khokhlov, A. N. (2016) Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 207-211, doi: 10.3103/S0096392516040088.
11. Ma, Y., Qi, M., An, Y., Zhang, L., Yang, R., Doro, D. H., Liu, W., and Jin, Y. (2018) Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging, *Aging Cell*, **17**, 12709, doi: 10.1111/acel.12709.
12. Rastaldo, R., Vitale, E., and Giachino, C. (2020) Dual role of autophagy in regulation of mesenchymal stem cell senescence, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 276-282, doi: 10.3389/fcell.2020.00276.
13. Chang, T. C., Hsu, M. F., and Wu, K. K. (2015) High glucose induces bone marrow-derived mesenchymal stem cell senescence by upregulating autophagy, *PLoS One*, **10**, e0126537, doi: 10.1371/journal.pone.0126537.
14. Zheng, Y., Hu, C. J., Zhuo, R. H., Lei, Y. S., Han, N. N., and He, L. (2014) Inhibition of autophagy alleviates the senescent state of rat mesenchymal stem cells during long-term culture, *Mol. Med. Rep.*, **10**, 3003-3008, doi: 10.3892/mmr.2014.2624.
15. Liu, F., Lee, J. Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J. D., Morrison, S. J., and Guan, J.-L. (2010) FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells, *Blood*, **116**, 4806-4814, doi: 10.1182/blood-2010-06-288589.
16. Ou, X., Lee, M. R., Huang, X., Messina-Graham, S., and Broxmeyer, H. E. (2014) SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress, *Stem Cells*, **32**, 1183-1194, doi: 10.1002/stem.1641.
17. García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A. L., Sandri, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2016) Autophagy maintains stemness by preventing senescence, *Nature*, **529**, 37-42, doi: 10.1038/nature16187.
18. Herberg, S., Shi, X., Johnson, M. H., Hamrick, M. W., Isales, C. M., and Hill, W. D. (2013) Stromal cell-derived factor-1beta mediates cell survival through enhancing autophagy in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **8**, e58207, doi: 10.1371/journal.pone.0058207.
19. Lu, J., Li, Z., Wu, X., Chen, Y., Yan, M., Ge, X., and Yu, J. (2019) iRoot BP Plus promotes osteo/odontogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *via* MAPK pathways and autophagy, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 222-235, doi: 10.1186/s13287-019-1345-3.
20. Ceccariglia, S., Cargnoni, A., Silini, A. R., and Parolini, O. (2020) Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells, *Autophagy*, **16**, 28-37, doi: 10.1080/15548627.2019.1630223.
21. Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J., and Elledge, S. J. (2015) The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4, *Science*, 349, 5612, doi: 10.1126/science.aaa5612.
22. Kang, C., and Elledge, S. J. (2016) How autophagy both activates and inhibits cellular senescence, *Autophagy*, **12**, 898-899, doi: 10.1080/15548627.2015.1121361.
23. Ratushnyy, A., Lobanova, M., and Buravkova, L. B. (2017) Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at "physiologic" hypoxia attenuates replicative senescence, *Cell Biochem. Funct.*, **35**, 232-243, doi: 10.1002/cbf.3267.
24. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, **7**, 211-228, doi: 10.1089/107632701300062859.
25. Buravkova, L. B., Grinakovskaya, O. S., Andreeva, E. R., Zhambalova, A. P., and Kozionova, M. P. (2009) Characteristics of mesenchymal stromal cells from human lipoaspirate cultivated at decreased oxygenation, *Tsitologiya*, **51**, 5-11, doi: 10.1134/S1990519X09010039.
26. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement, *Cytotherapy*, **8**, 315-317, doi: 10.1080/14653240600855905.
27. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
28. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9363-9367, doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
29. Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 729-740, doi: 10.1038/nrm2233.

30. Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitinger, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., and Lepperdinger, G. (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan, *Aging Cell*, **6**, 745-757, doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
31. Mathew, S. A., Rajendran, S., Gupta, P. K., and Bhonde, R. (2013) Modulation of physical environment makes placental mesenchymal stromal cells suitable for therapy, *Cell Biol. Int.*, **37**, 1197-1204, doi: 10.1002/cbin.10154.
32. Valorani, M. G., Montelatici, E., Germani, A., Biddle, A., D'Alessandro, D., Strollo, R., Patrizi, M. P., Lazzari, L., Nye, E., Otto, W. R., Pozzilli, P., and Alison, M. R. (2012) Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials, *Cell Prolif.*, **45**, 225-238, doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00817.x.
33. Pilgaard, L., Lund, P., Duroux, M., Fink, T., Ulrich-Vinther, M., Søballe, K., and Zachar, V. (2009) Effect of oxygen concentration, culture format and donor variability on *in vitro* chondrogenesis of human adipose tissue-derived stem cells, *Regen. Med.*, **4**, 539-548, doi: 10.2217/rme.09.28.
34. Choi, J. R., Pingguan-Murphy, B., Wan Abas, W. A., Yong, K. W., Poon, C. T., et al. (2015) *In situ* normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumourigenesis, *PLoS One*, **10**, e0115034, doi: 10.1371/journal.pone.0115034.
35. Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., Quiñones-Hinojosa, A. (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche, *Cell Stem Cell*, **7**, 150-161, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007.
36. Reeg, S., and Grune, T. (2015) Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxid. Redox. Signal.*, **23**, 239-255, doi: 10.1089/ars.2014.6062.
37. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J. D. (2000) Senescence-associated (Beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells, *J. Cell Sci.*, **113**, 3613-3622, PMID: 11017877.
38. Gómez-Sintes, R., Ledesma, M. D., and Boya, P. (2016) Lysosomal cell death mechanisms in aging, *Ageing Res Rev.*, **32**, 150-168, doi: 10.1016/j.arr.2016.02.009.
39. Bertolo, A., Baur, M., Guerrero, J., Pötzel, T., and Stoyanov, J. (2019) Autofluorescence is a reliable *in vitro* marker of cellular senescence in human mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.*, **9**, 2074-2088, doi: 10.1038/s41598-019-38546-2.
40. Brunk, U. T., and Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and infuence on cell function, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 611-619, doi: 10.1016/s0891-5849(02)00959-0.
41. Rodier, F., and Campisi, J. (2011) Four faces of cellular senescence, *J. Cell Biol.*, **192**, 547-556, doi: 10.1083/jcb.201009094.
42. Legzdina, D., Romanauska, A., Nikulshin, S., Kozlovska, T., and Berzins, U. (2016) Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Int. J. Stem Cells*, **9**, 124-136, doi: 10.15283/ijsc.2016.9.1.124.
43. Ratushnyy, A. Y., Rudimova, Y. V., and Buravkova, L. B. (2019) Alteration of hypoxia-associated gene expression in replicatively senescent mesenchymal stromal cells under physiological oxygen level, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 263-271, doi: 10.1134/S0006297919030088.
44. Korovilaa, I., Hugoa, M., Castroa, J. P., Webera, D., Höhna, A., Grunea, T., and Junga, T. (2017) Proteostasis, oxidative stress and aging, *Redox Biol.*, **13**, 550-567, doi: 10.1016/j.redox.2017.07.008.
45. Yang, M., Wen, T., Chen, H., Deng, J., Yang, C., and Zhang, Z. (2018) Knockdown of insulin-like growth factor 1 exerts a protective effect on hypoxic injury of aged BM-MSCs: role of autophagy, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 284-301, doi: 10.1186/s13287-018-1028-5.
46. Kovaleva, O. V., Shitova, M. S., and Zborovskaya, I. B. (2014) Autophagy: the cell death or a manner of survival? *Klinich. Onkogematologiya*, **7**, 103-113.
47. Zhang, M., Du, Y., Lu, R., Shu, Y., Zhao, W., et al. (2016). Cholesterol retards senescence in bone marrow mesenchymal stem cells by modulating autophagy and ROS/P53/P21Cip1/Waf1 pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 7524308, doi: 10.1155/2016/7524308.
48. Ghavami, S., Cunnington, R. H., Gupta, S., Yeganeh, B., Filomeno, K. L., Freed, D. H., Chen, S., Klonisch, T., Halayko, A. J., Ambrose, E., Singal, R., and Dixon, I. M. C. (2015) Autophagy is a regulator of TGF-β1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts, *Cell Death Dis.*, **6**, 1696, doi: 10.1038/cddis.2015.36.
49. Martin, D. D. O., Ladha, S., Ehrnhoefer, D. E., and Hayden, M. R. (2015) Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy, *Trends. Neurosci.*, **38**, 26-35, doi: 10.1016/j.tins.2014.09.003.
50. Zhou, F., Yang, Y., and Xing, D. (2011) Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis, *FEBS J.*, **278**, 403-413, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07965. x.
51. Thorburn, J., Moore, F., Rao, A., Barclay, W. W., Thomas, L. R., Grant, K. W., Cramer, S. D., and Thorburn, A. (2005) Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1189-1199, doi: 10.1091/mbc.e04-10-0906.
52. Judith, D., Jefferies, H. B. J., Boeing, S., Frith, D., Snijders, A. P., and Tooze, S. A. (2019) ATG9A shapes the forming autophagosome throughArfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ, *J. Cell Biol.*, **218**, 1634-1652.
53. Chandrachud, U., Walker, M. W., Simas, A. M., Heetveld, S., Petcherski, A., et al. (2015) Unbiased cell-based screening in a neuronal cell model of batten disease highlights an interaction between Ca2 homeostasis, autophagy, and CLN3 protein function, *J. Biol. Chem.*, **290**, 14361-14380, doi: 10.1074/jbc.M114.621706.
54. Boyer-Guittaut, M., Poillet, L., Liang, Q., Bôle-Richard, E., Ouyang, X., et al. (2014) Affiliations expand the role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells, *Autophagy*, **10**, 986-1003, doi: 10.4161/auto.28390.
55. Hah, Y. S., Noh, H. S., Ha, J. H., Ahn, J. S., Hahm, J. R., Cho, H. Y., and Kim, D. R. (2012) Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells, *Cancer Lett.*, **323**, 208-214, doi: 10.1016/j.canlet.2012.04.012.
56. D'Eletto, M., Farrace, M. G., Falasca, L., Reali, V., Oliverio, S., Melino, G., Griffin, M., Fimia, G. M., and Piacentini, M. (2009) Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation, *Autophagy*, **5**, 1145-1154.

SENESCENCE AND AUTOPHAGY GENE EXPRESSION IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

A. Ratushnyy*, Y. Rudimova, and L. Buravkova

Institute of Biomedical Problems (IBMP), Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia; E-mail: ratushkin@mail.ru

Received July 21, 2020
Revised August 5, 2020
Accepted August 5, 2020

Cell senescence leads to a number of changes in the properties of mesenchymal stromal cells (MSCs). In particular, the number of damaged structures is increased producing negative effect on intracellular processes. Elimination of the damaged molecules and organelles occurs via autophagy that can be important in the context of aging. Cultivation under low oxygen level can be used as an approach for enhancement of MSC therapeutic properties and "slowing down" cell senescence. The goal of this work was to study some morphological and functional characteristics and expression of autophagy-associated genes during replicative senescence of MSCs under different oxygen concentration. The study revealed changes in the regulation of autophagy at the transcriptional level. Upregulation of the expression of autophagosome membrane growth genes *ATG9A* and *ULK1*, of the autophagosome maturation genes *CTSD*, *CLN3*, *GAA*, and *GABARAPL1*, of the autophagy regulation genes *TP53*, *TGFB1*, *BCL2L1*, *FADD*, and *HTT* was shown. These changes were accompanied by downregulation of *IGF1* and *TGM2* expression. Increase of the lysosomal compartment volume was observed in the senescent MSCs that also indicated increase of their degradation activity. The number of lysosomes was decreased following prolonged cultivation under low oxygen concentration (5%). The replicative senescence of MSCs under conditions of different oxygen levels led to the similar modifications in the expression of the autophagy-associated genes.

Keywords: mesenchymal stromal cells, replicative senescence, autophagy, hypoxia

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1383 – 1397

УДК 571.27

НЕТоз: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РОЛЬ В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ

Обзор

© 2020 Н.В. Воробьева[1]*, Б.В. Черняк[2]

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: nvvorobjeva@mail.ru*

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

Поступила в редакцию 20.06.2020
После доработки 16.07.2020
Принята к публикации 16.07.2020

НЕТоз – это программа образования нейтрофильных внеклеточных ловушек или NET (neutrophil extracellular traps), состоящих из модифицированного хроматина и связанных с ним бактерицидных белков гранул и цитоплазмы. НЕТоз могут вызывать различные патогены, антитела и иммунные комплексы, цитокины, микрокристаллы и другие физиологические стимулы. Индукция НЕТоза зависит от активных форм кислорода (АФК), основным источником которых служит NADPH-оксидаза. Активация NADPH-оксидазы зависит от повышения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и в некоторых случаях от генерации АФК в митохондриях. В процессе НЕТоза происходит выход компонентов гранул в цитозоль, модификация гистонов, ведущая к деконденсации хроматина, разрушение ядерной оболочки, а также образование пор в плазматической мембране. В обзоре обсуждаются основные представления о механизмах НЕТоза, а также роль НЕТоза в патогенезе некоторых заболеваний, включая COVID-19.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейтрофил, нейтрофильные внеклеточные ловушки, НЕТоз, NADPH-оксидаза, активные формы кислорода, митохондриальная пора, COVID-19.

DOI: 10.31857/S0320972520100061

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы являются самой многочисленной популяцией миелоидных лейкоцитов, составляющей в норме 50–70% всех лейкоцитов крови. Нейтрофилы дифференцируются в костном мозге из гематопоэтических стволовых клеток и после полного созревания выходят в кровяное русло. В кровотоке нейтрофилы циркулируют не более 72 ч, после чего они либо возвращаются в костный мозг, где их фагоцитируют резидентные макрофаги, или подвергаются апоптозу в периферических тканях, где также фагоцитируются. При инфицировании организма хозяина нейтрофилы немедленно мигрируют из кровотока в очаг воспаления, обеспечивая «первую линию» защиты от патогенов.

Будучи «профессиональными» фагоцитами, нейтрофилы содержат в своих гранулах огромный антимикробный «арсенал», позволяющий им уничтожать патогены в процессе фагоцитоза. Бактерицидные ферменты также могут выбрасываться из клеток в процессе дегрануляции. Активация NADPH-оксидазы приводит к массовой генерации активных форм кислорода (АФК), которые участвуют в уничтожении патогенов как вне, так и внутри клеток. Наконец, существует еще один антимикробный механизм, который заключается в высвобождении нейтрофильных внеклеточных ловушек или NET, состоящих из модифицированного хроматина, «декорированного» бактерицидными белками гранул и цитоплазмы. Этот феномен был впервые описан в работе Takei et al. [1] и в дальнейшем детально охарактеризован Brinkmann et al. [2]. Поскольку первоначально было показано, что образование NET сопровождается гибелью клеток, этот процесс был назван НЕТозом [3].

Принятые сокращения: GSDMD – газдермин D; МРО – миелопероксидаза; mPTP – неселективная митохондриальная пора (mitochondrial permeability transition pore); NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps); РКС – протеинкиназа С; АФК – активные формы кислорода; ЛПС – липополисахарид бактериальной стенки; НЭ – нейтрофильная эластаза; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром; ПГК – программированная гибель клетки; ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетат; ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких.

* Адресат для корреспонденции.

Образование NET может активироваться различными патогенами, такими как бактерии, грибы, простейшие, вирусы, а также липополисахаридами бактериальной клеточной стенки (ЛПС). НЕТоз могут индуцировать антитела и иммунные комплексы, цитокины и хемокины (IL-8, TNF), микрокристаллы и другие физиологические стимулы [4–8]. В экспериментах *in vitro* для индукции НЕТоза часто используют форболовые эфиры (в частности, форбол-12-миристат-13-ацетат, ФМА), которые имитируют действие диацилглицерола, активируя протеинкиназу *c*, а также кальциевые (иономицин, A23187) и калиевые (нигерицин) ионофоры.

В настоящее время описаны две принципиально различающиеся формы НЕТоза: классический или суицидальный НЕТоз, который приводит к гибели клетки, и прижизненный или витальный, при котором клетка сохраняет не только жизнеспособность, но и многие эффекторные функции (см. ниже).

Классический НЕТоз представляет собой особую форму программируемой гибели клеток (ПГК), для которой характерны выход компонентов гранул в цитозоль, а также деконденсация хроматина, связанная с модификацией гистонов. В то же время многие черты, характерные для других форм ПГК (апоптоз, некроптоз, пироптоз, аутофагическая гибель, вторичный некроз), присущи и НЕТозу. Подобно апоптозу, при НЕТозе происходят координированные изменения в ядре и цитоплазме, хотя природа изменений различна, и НЕТоз, в отличие от апоптоза, не требует активации каспаз. При НЕТозе (как и при других формах ПГК) нарушаются изолирующие свойства плазматической мембраны, и механизмы пермеабилизации сходны для НЕТоза, пироптоза и некроптоза. Сигнальные механизмы НЕТоза могут включать активацию фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) [9], которая контролирует также индукцию аутофагической гибели, однако сборка аутофагосом для НЕТоза не требуется [10]. Особенно тесно могут переплетаться пути, ведущие к НЕТозу и некроптозу [11–13]. Долгое время считалось, что митохондрии не играют заметной роли в функционировании нейтрофилов, поскольку в этих клетках их содержание невелико, энергетика поддерживается гликолизом, а основным источником АФК служит NADPH-оксидаза. Далее, однако, выяснилось, что митохондрии участвуют в передаче сигналов, определяющих основные ответы нейтрофилов на патогены [14]. Было установлено, что митохондриальные АФК участвуют в активации NADPH-оксидазы и индукции НЕТоза, вызванного различными стимулами [15, 16].

Образование NET было показано также у других типов иммунных клеток – эозинофилов и тучных клеток [17], базофилов [18], моноцитов [19] и макрофагов [20]. Интересно, что деконденсированный хроматин используют для защиты от патогенов не только животные, но и одноклеточные эукариоты [21], а также растения [22]. Таким образом, можно предположить, что использование хроматина с целью защиты хозяина от патогенов возникло достаточно рано в эволюции эукариот.

В последние годы накапливаются данные о роли НЕТоза при многих патологиях, связанных с воспалительными процессами. Это привело к всплеску публикаций о НЕТозе. В базе данных PubMed можно найти почти 3000 публикаций на эту тему, и из них около трети приходятся на 2018–2020 гг. Такие интенсивные исследования позволили значительно продвинуться в понимании природы НЕТоза, но одновременно привели к накоплению данных, которые противоречат друг другу. В данном обзоре рассмотрены базовые представления о механизмах НЕТоза, определяющие его место в ряду других форм ПГК. Кроме того, показана роль НЕТоза в патогенезе некоторых заболеваний.

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ NET

Участие АФК, образуемых NADPH-оксидазой и митохондриями, в индукции НЕТоза. В первых классических работах A. Zychlinsky [23] было показано, что НЕТоз, вызванный *Staphilococcus aureus* или ФМА, зависит от АФК, продуцируемых NADPH-оксидазой. Интересно, что в нейтрофилах больных хронической гранулематозной болезнью (ХГБ), не имеющих функциональной NADPH-оксидазы, экзогенные АФК способствовали образованию NET [23]. Основной механизм активации NADPH-оксидазы связан с фосфорилированием её субъединиц при участии протеинкиназы *c* (PKC), что ведет к сборке активного фермента на мембране [24]. В то же время при НЕТозе, вызванном *Helicobacter pylori*, активация NADPH-оксидазы происходила при участии киназ c-Raf, MEK, Akt и ERK, и PKC была также необходима [25]. НЕТоз, индуцированный паразитом *Entamoeba histolytica*, также зависел от активации киназного каскада c-Raf-MEK-ERK, но участия PKC не наблюдалось [26]. Интересно, что сигнальный модуль c-Raf-MEK-ERK, а также PKC стимулируют экспрессию Mcl-1, основного антиапоптозного белка нейтрофилов [25]. По-видимому, индукция НЕТоза может быть сопряжена с подавлением апоптоза, что усиливает общий антимикробный эффект.

Основные механизмы активации NADPH-оксидазы при НЕТозе, скорее всего, мало отличаются от тех, которые обеспечивают окислительный взрыв нейтрофилов в ответ на патогены и иные стимулы. Изучая активацию NADPH-оксидазы под действием пептидного хемоаттрактанта *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (fMLP), который вызывает окислительный взрыв и дегрануляцию, но не НЕТоз, мы обнаружили, что в этих процессах важную роль играют митохондрии. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 в субмикромолярных концентрациях предотвращал активацию NADPH-оксидазы под действием fMLP, но не ФМА [15]. Митохондриальные АФК (мтАФК) стимулировали NADPH-оксидазу при участии PKC, но непосредственная мишень их действия осталась неизвестной. Это может быть и сама PKC, которая имеет два редокс-чувствительных серно-цинковых кластера в диацилглицерол-связывающем домене. Кроме того, некоторые члены семейства Src-киназ (в частности, киназа Lyn), стимулирующие PKC благодаря фосфорилированию остатков тирозина, активируются под действием АФК [27]. Еще один редокс-чувствительный механизм активации NADPH-оксидазы нейтрофилов основан на АФК-зависимой ассоциации белка дисульфидизомеразы с субъединицей p47phox, что приводит к её транслокации на мембрану с последующей сборкой NADPH-оксидазы [28].

Активация NADPH-оксидазы под действием мтАФК была впервые продемонстрирована Dikalova et al. [29] на эндотелиальных клетках. Они показали, что митохондриально-направленный антиоксидант MitoTEMPO и экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы SOD2 подавляют активацию NADPH-оксидазы, вызванную гормоном ангиотензином II, стимулирующим гипертонию. Дальнейшие исследования показали, что мтАФК в эндотелии стимулируют лишь одну из четырех изоформ NADPH-оксидазы – NOX2 [30], и именно эта изоформа характерна для нейтрофилов. В нейтрофилах была описана активация NADPH-оксидазы под действием миксотиазола, ингибитора комплекса III дыхательной цепи, который стимулировал продукцию мтАФК [31]. В нашем исследовании [15] повышение мтАФК и активности NADPH-оксидазы было вызвано сигналом от G-белок-связанного рецептора fMLP, который инициирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а также Ca^{2+}-независимую активацию PI3K. Оба этих сигнальных пути, по-видимому, важны для рецептор-опосредованной активация NADPH-оксидазы в нейтрофилах [27].

Ca^{2+}-зависимая генерация мтАФК может служить преобладающим источником АФК в случае индукции НЕТоза, вызванного Ca^{2+}-ионофорами (A23187 и иономицин) [32] и некоторыми другими стимулами [33, 34]. Это обстоятельство привело к формированию представлений о двух различных механизмах НЕТоза, один из которых не зависит от NADPH-оксидазы (см. обзор [5]). В действительности, в большинстве таких случаев мтАФК стимулируют NADPH-оксидазу, которая вносит свой вклад в инициацию НЕТоза. Так, например, в недавно проведенной нами работе [16] было показано, что НЕТоз, индуцированный A23187, подавляется как под действием митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1, так и специфических ингибиторов NADPH-оксидазы. Вместе с тем было также показано, что в нейтрофилах, выделенных из крови пациентов с Х-сцепленной ХГБ, образование NET в ответ на A23187 зависит от усиленной генерации мтАФК без участия NADPH-оксидазы [16]. Предположено, что у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов мтАФК образуются с повышенной интенсивностью благодаря избыточному накоплению Ca^{2+}, и их количества хватает для запуска НЕТоза [35]. Неконтролируемое поступление Ca^{2+} в цитоплазму нейтрофилов при ХГБ объясняется, по-видимому, отсутствием электрогенной функции NADPH-оксидазы и деполяризации мембраны при активации [36].

Наши исследования показали, что генерация мтАФК, вызванная как fMLP, так и A23187, зависит от открытия неселективной митохондриальной поры (mPTP) [16]. Этот факт долго оставался незамеченным, вероятно, из-за того, что наиболее известный ингибитор mPTP циклоспорин A (CsA) является также ингибитором цитоплазматической фосфатазы кальциневрина, которая участвует в передаче многочисленных Ca^{2+}-зависимых сигналов [37]. Мы же использовали ингибиторы mPTP санглиферин A и бонгкрековую кислоту, которые не влияют на кальциневрин. Интересно, что при активации fMLP не наблюдалось значительного снижения мембранного потенциала митохондрий и не происходило их набухания, характерного для продолжительного открытия mPTP. Скорее всего, в данном случае происходило кратковременное обратимое открытие поры, вызванное кратковременным повышением цитоплазматического Ca^{2+}, характерного для стимуляции fMLP. Этот режим открытия mPTP был описан как для изолированных митохондрий [37], так и для клеточных моделей [38]. Сигнальная функция открытия mPTP и связанная с этим продукция мтАФК была описана ранее в эндотелиальных

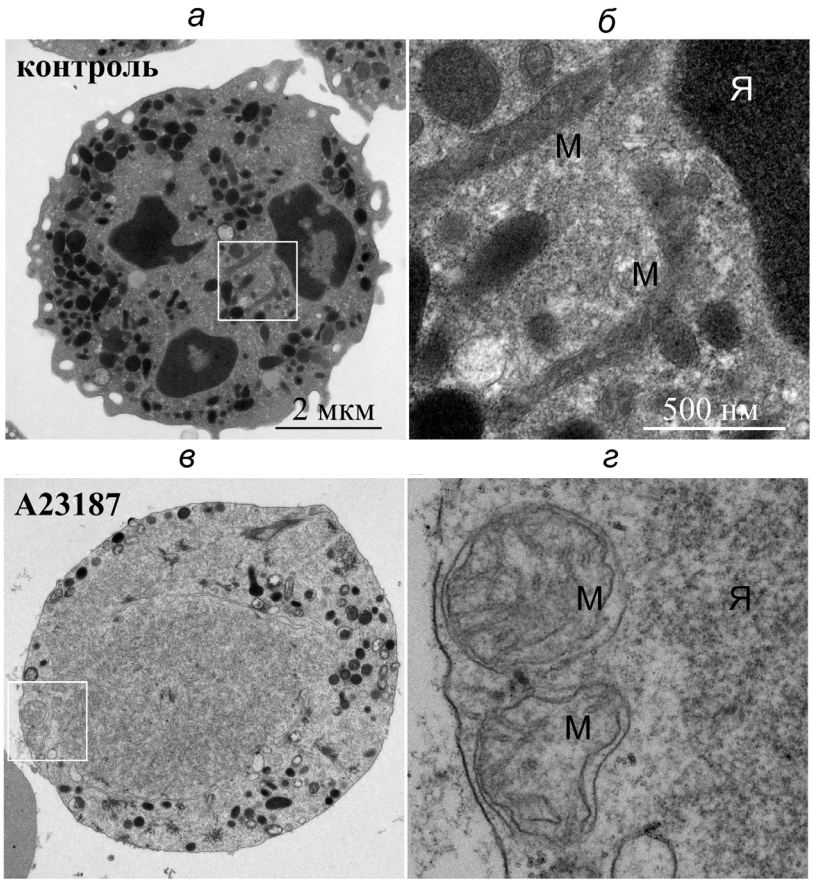


Рис. 1. Электронная микроскопия нейтрофилов, находящихся на ранних стадиях НЕТоза. *а*, *б* – Интактный нейтрофил человека; *в*, *г* – нейтрофил, стимулированный 2 мкМ A23187 в течение 30 мин. В клетках наблюдалась деконденсация хроматина, характерная для НЕТоза. Одновременно происходило набухание митохондрий, что свидетельствовало об открытии неселективной митохондриальной поры (mPTP). Масштаб: 2 мкм (*а*, *в*) и 500 нм (*б*, *г*) [16]. Изображения получены С.А. Голышевым (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ) и цитируются с любезного разрешения издательства Elsevier

клетках [30] и нейтрофилах, обработанных миксотиазолом [31].

НЕТоз, индуцированный A23187, также зависел от открытия mPTP [16]. В данном случае электронно-микроскопическое исследование выявило значительное набухание митохондрий, которое совпадало с деконденсацией хроматина и разрушением ядерной оболочки (рис. 1).

Можно полагать, что значительное повышение цитоплазматического Ca^{2+} под действием A23187 привело к продолжительному открытию поры. Ca^{2+}-зависимое открытие mPTP стимулировало образование мтАФК, а ингибиторы mPTP предотвращали их накопление. Непосредственной причиной избыточного образования мтАФК, возможно, послужил выход из митохондрий через пору основных компонентов их антиоксидантной защиты, NADPH [38] и восстановленного глутатиона [16]. Наряду с Ca^{2+} эффективным индуктором mPTP является окислительный стресс [37]. Возможно, АФК, образуемые NADPH-оксидазой, проникнув в клетку, стимулируют открытие mPTP, создавая петлю усиления, ведущую к НЕТозу (рис. 2).

Открытие митохондриальной поры издавна рассматривается как один из этапов реализации программы апоптоза [39]. Первоначально предполагалось, что вызванное порой набухание матрикса вызывает разрыв внешней мембраны митохондрий и выход проапоптозных белков (в частности, цитохрома *c*) из межмембранного пространства в цитоплазму. В дальнейшем эта гипотеза была модифицирована с учётом данных о выходе цитохрома *c* через белковые поры в мембране. Предполагалось, что открытие mPTP способствует изменению морфологии внутренней мембраны и освобождению цитохрома *c* из пространства внутри крист [40]. Детали этого механизма остаются не вполне понятными, но не вызывает сомнений, что специфические ингибиторы поры предотвращают апоп-

тоз в различных моделях. Несомненна также и возможность участия mPTP в индукции некротической гибели. В частности, это наблюдается при ишемии/реперфузии сердца и определяет защитное действие ингибиторов поры [41]. Приведенные выше данные позволяют поставить НЕТоз, индуцированный кальциевыми ионофорами, в этот ряд ПГК. Обнаруженное нами участие мтАФК в активации NADPH-оксидазы при таком НЕТозе, который часто называют NADPH-оксизада-независимым, указывает на то, что его правильнее именовать митохондриально-зависимым НЕТозом.

Механизмы реализации программы НЕТоза. Важным событием при НЕТозе является выход различных белков из гранул в цитозоль. Прежде всего, это касается азурофильных гранул, в состав которых входит белковый комплекс «азуросома». Она включает восемь типов белков, три из которых представляют собой высокогомологичные сериновые протеазы – нейтрофильная эластаза (НЭ), катепсин G и азуроцидин, и, кроме того, миелопероксидазу (МРО), фермент, который вырабатывает гипохлорит-анион, используя в качестве субстратов хлор и пероксид водорода. Показано, что АФК вызывают диссоциацию азуросомы, что приводит к выходу сериновых протеаз и МРО из гранул в цитозоль [42]. Сериновые протеазы (прежде всего, НЭ) расщепляют элементы цитоскелета, что способствует протеканию НЕТоза [43]. Кроме того, они мигрируют в ядро, где расщепляют ламину и гистоны, способствуя деконденсации хроматина и разрушению ядерной оболочки. Важную роль в диссоциации азуросомы и выходе протеаз из гранул играет МРО [42, 44]. Интересно, что ферментативная активность МРО для этого не нужна. Возможно, этот гем-содержащий белок служит внутриклеточным рецептором перекиси водорода. Тем не менее, активность МРО требуется для НЕТоза, поскольку гипохлорит-анион стимулирует активность нейтрофильной эластазы [42]. Следует отметить, что АФК-зависимый выход белков из гранул при НЕТозе во многом напоминает АФК-зависимую пермеабилизацию лизосом и выход из них катепсинов, что характерно для многих вариантов некроза [45].

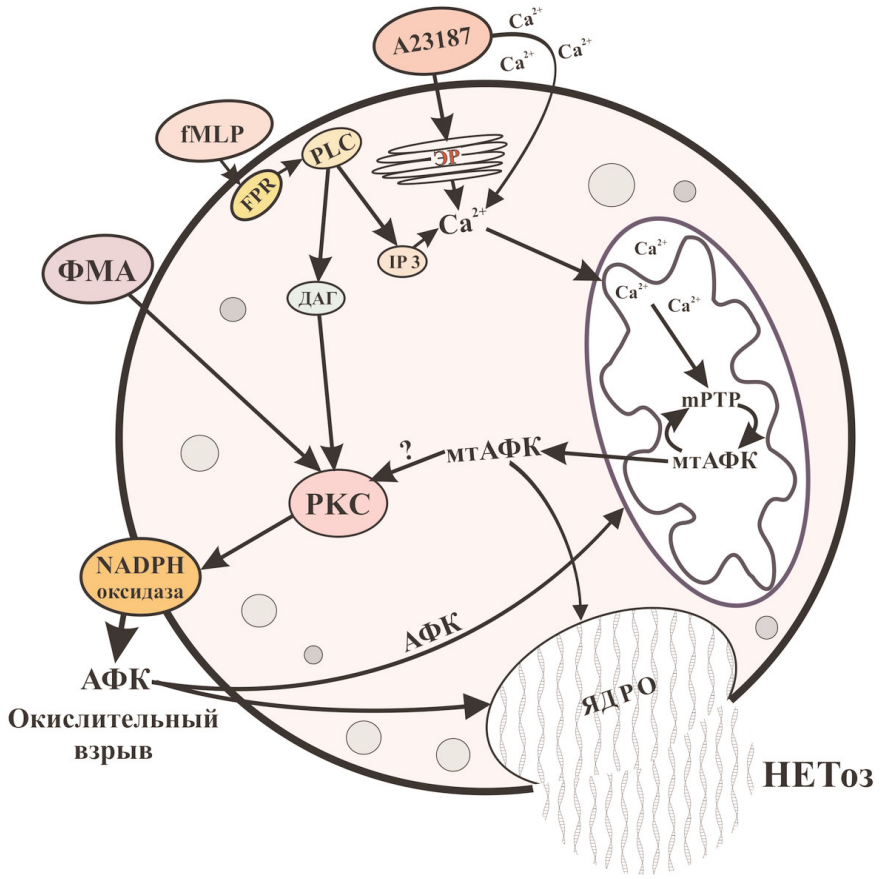


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая различные механизмы НЕТоза

Из цитоплазмы в ядро также поступает пептидил-аргинин дезаминаза 4 (PAD4), которая катализирует цитруллинирование гистонов, что приводит к окончательной деконденсации хроматина. Ингибирование PAD4 предотвращает деконденсацию хроматина и НЕТоз, вызванные Ca^{2+}-ионофором или бактерией *Shigella flexneri*, а нейтрофилы, полученные из мышей с нокаутом по гену *PAD4*, не формируют NET в ответ на ФМА [46]. Пептидил-аргинин дезаминазы являются Ca^{2+}-связывающими белками и их активность стимулируется Ca^{2+}. С другой стороны, PAD4 активируется и вызывает цитруллинирование гистонов в ответ на добавку пероксида водорода [46]. Кроме того, ЛПС-зависимое цитруллинирование гистонов и НЕТоз зависят от интактности микротрубочек [47]. По всей видимости, сочетание всех этих факторов необходимо для активации PAD4. Наряду с пептидил-аргинин дезаминазой, модификация гистонов при НЕТозе может включать и ацетилирование, но его роль в НЕТозе пока мало изучена [5]. Деконденсация хроматина, а также протеолитическое повреждение ядерной ламины приводят к разрушению ядерной оболочки и выходу хроматина в цитоплазму. Недавно было показано, что НЕТоз может происходить благодаря активации циклин-зависимых киназ (CDK), которые способствуют вступлению в клеточный цикл [48]. Возможно, такие части аппарата митоза, как фосфорилирование ламина и расхождение центросом, используются для разрушения ядерной оболочки при НЕТозе.

На завершающей стадии НЕТоза происходит образование пор в плазматической мембране и освобождение хроматина во внешнюю среду с образованием NET. Белки, вышедшие из гранул, прочно связываются с деконденсированным хроматином благодаря электростатическому взаимодействию. Поры, пропускающие эти гигантские комплексы, формируются белком газдермином D (GSDMD), который формирует также поры в мембране макрофагов при пироптозе. В отличие от пироптоза, где активация GSDMD происходит благодаря расщеплению под действием каспаз-1 и -4/5 (каспаза-11, у мышей), в нейтрофилах его расщепляет и активирует преимущественно нейтрофильная эластаза [49, 50]. Активация GSDMD, возможно, приводит к формированию пор не только в плазматической, но и в ядерной мембране [51]. Каспаза-зависимая активация GSDMD в нейтрофилах также возможна в результате неканонической активации инфламмасомы [51], однако роль этого механизма в НЕТозе требует дальнейшего изучения. Родственный GSDMD газдермин E активируется каспазой-3, что приводит к пермеабилизации митохондрий и усилению апоптоза, а также ко вторичному некрозу [52, 53]. При некроптозе под действием RIP киназ происходит активация другого порообразующего белка MLKL (не родственного газдерминам), что также приводит к выбросу NET [11–13].

Физиологическая модуляция НЕТоза. В физиологических условиях отношение концентраций CO_2/HCO_3^-, pH и содержание O_2 могут модулировать НЕТоз. В умеренно щелочных условиях и при сниженном соотношении CO_2/HCO_3^- уровень НЕТоза, вызванного ФМА, Ca^{2+}-ионофором, микрокристаллами мочевой кислоты и ЛПС, был повышен [54]. Повышение pH в цитоплазме нейтрофилов вызывало увеличение концентрации Ca^{2+} и усиленную продукцию АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [55]. Снижение pH среды вызывает угнетение НЕТоза, возможно, благодаря торможению гликолиза [56]. Кроме того, при низком pH резко снижается вероятность открытия mPTP [37], что может понизить продукцию мтАФК [16]. Предполагается, что pH-зависимость НЕТоза приводит к тому, что на периферии очага воспаления он максимально активирован и предохраняет ткань от проникновения патогенов, а в центре очага, для которого характерен низкий pH, НЕТоз ослаблен и не усиливает повреждение тканей [54]. Сведения о влиянии гипоксии на НЕТоз противоречивы. С одной стороны, нокаут Hif-1α (основного транскрипционного фактора, регулирующего адаптацию к гипоксии) подавлял НЕТоз, а фармакологическая стабилизация Hif-1α его стимулировала [57]. С другой стороны, НЕТоз, вызванный ФМА (но не *S. aureus*), при гипоксии понижался, и этот эффект не зависел от Hif-1α [58]. Помимо состава среды, НЕТоз зависит от её осмолярности, так что гипертоническая среда подавляла продукцию АФК и НЕТоз. Уровень АФК в данном случае был критичен, так как добавление пероксида водорода восстанавливало НЕТоз [59].

Цитокины и медиаторы воспаления играют важную роль в активации НЕТоза, в то же время некоторые антивоспалительные факторы могут вызывать обратный эффект. Так, простагландин E2, играющий важную роль в разрешении воспаления, ингибирует НЕТоз благодаря увеличению внутриклеточного содержания циклического АМФ [60, 61]. Активированный C-белок (сериновая протеиназа, обладающая противосвертывающим и противовоспалительным действием) также может ингибировать НЕТоз благодаря связыванию со специфическим рецептором (EPCR) или взаимодействию с протеаза-активируемым рецептором 3 (PAR3) и ин-

тегринами CD11b/CD18 (Mac-1). Интересно, что тот же активированный С-белок может расщеплять гистоны, входящие в состав NET [62]. Показано, что НЕТоз подавляется важным противовоспалительным цитокином IL-10 [63]. Пептиды, эффективно подавляющие образование NET, были обнаружены в пуповинной крови. Наиболее распространенный пептид получил название «неонатальный NET-ингибирующий фактор» (nNIF). Этот пептид избирательно ингибировал НЕТоз, не влияя на фагоцитоз и другие функции нейтрофилов. Его внутривенное введение защищало мышей от системного воспаления, вызванного ЛПС, и от микробного сепсиса [64].

Патогенные микроорганизмы обладают широким спектром приспособлений, препятствующих микробицидному действию NET [65]. Многие микроорганизмы вырабатывают литические ферменты (прежде всего, эндонуклеазы), разрушающие NET. Такие бактерии, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, а также грибы рода *Aspergillus*, вырабатывают защитные и маскирующие внеклеточные оболочки. В случае *P. aeruginosa* покрытие сиаловыми кислотами вызывает продукцию IL-10, который подавляет НЕТоз. Этот же механизм, по-видимому, использует вирус иммунодефицита человека (HIV-1). Вирионы HIV-1 стимулируют выработку IL-10 дендритными клетками, что защищает вирус от литического действия ферментов, входящих в NET [63]. Вирус гепатита В (HBV) ингибирует НЕТоз, подавляя продукцию АФК в нейтрофилах с помощью белка оболочки HBE и корового белка HBC [66].

ПРИЖИЗНЕННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ NET

Наряду с описанным выше суицидальным НЕТозом существуют также механизмы выброса ДНК, при которых нейтрофилы сохраняют свою жизнеспособность и естественные эффекторные функции [6]. Для описания этих процессов был использован термин «витальный НЕТоз». Однако Комитет по номенклатуре клеточной гибели в 2018 г. [67] не рекомендовал использовать термин НЕТоз для процессов, не сопряженных с гибелью клетки. Впервые прижизненный выброс хроматина был описан в системе, где присутствовали нейтрофилы и тромбоциты, активированные ЛПС, которые связывались с TLR4 [68]. НЕТоз в данном случае происходил значительно быстрее, чем при индукции ФМА, а роль NADPH-оксидазы и АФК не была изучена. К сожалению, эта интересная модель, имеющая очевидное физиологическое значение, в дальнейшем не была исследована. Сходный витальный выброс хроматина наблюдали *in vivo* при заражении кожи грамположительными бактериями [69]. Для индукции этого процесса требовалась опсонизация бактерий, которые взаимодействовали с TLR2 и активировали систему комплемента. Интересно, что после выброса хроматина безъядерные нейтрофилы были способны к хемотаксису и фагоцитозу бактерий.

Массированный и очень быстрый выброс митохондриальной ДНК (мтДНК) без утраты жизнеспособности наблюдался в эозинофилах и нейтрофилах, праймированных провоспалительными цитокинами IL-5/IFN-γ или GM-CSF, соответственно, и стимулированных ЛПС [70, 71]. В обоих типах гранулоцитов этот процесс зависел от активности NADPH-оксидазы. Аналогичный феномен наблюдался и в случае базофилов [18]. Сходный выброс мтДНК был обнаружен у В- и Т-лимфоцитов, а также у натуральных киллерных клеток (NK-клетки) в ответ на олигодезоксинуклеотиды [72]. В отличие от гранулоцитов, выброс митохондриальной ДНК из лимфоцитов не зависел от NADPH-оксидазы. Вопрос о функциональной роли внеклеточной мтДНК остается открытым. Низкое содержание митохондрий в нейтрофилах и особенно в эозинофилах делает маловероятным образование функциональных митохондриальных ловушек. В случае лимфоцитов внеклеточная мтДНК не содержала литических ферментов и, скорее всего, выполняла сигнальную функцию. В частности, мтДНК стимулировала экспрессию и секрецию интерферонов I типа мононуклеарами периферической крови [72]. Следует отметить, что внеклеточная мтДНК (часто окисленная) встречается в крови при широком спектре патологий, включая системную красную волчанку, аутоиммунное заболевание, в патогенезе которого важную роль играет НЕТоз [33].

РОЛЬ НЕТоза В ЗАЩИТЕ ХОЗЯИНА И ПАТОЛОГИИ

В первых же работах по НЕТозу высказывали соображения о физиологической защитной роли этого явления. В частности, структуры, подобные NET, были обнаружены в содержимом аппендикса [2]. В дальнейшем NET были обнаружены в очень большом числе органов и тканей [6], однако вопрос о его защитном действии по-прежнему остается открытым. НЕТоз наблюдается в очагах инфекций и, по-видимому, замедляет распространение патогенов. Так, показано, что НЕТоз при стафилококковой ин-

фекции кожи тормозит проникновение патогенов в кровоток [69]. Мыши, не способные к НЕТозу из-за нокаута гена *PAD4*, значительно сильнее страдали от некротического фасциита, вызванного *Streptococcus pyogenes* группы А [46]. Однако избыточное образование NET, связанное как с усиленным НЕТозом, так и с нарушением механизмов их устранения, может приводить к воспалительным и аутоиммунным патологиям, а также к закупорке протоков и кровеносных сосудов.

НЕТоз на поверхности эпителия. Микроорганизмы постоянно атакуют эпителиальные барьеры, индуцируя образование NET на поверхности слизистой полости рта, глаз и коже. Поэтому образование NET и их деградация должны строго регулироваться, чтобы не вызвать воспаления в этих тканях. Был описан ряд заболеваний, в которых NET играют как противомикробную, так и патогенетическую роль.

На поверхности роговицы глаза НЕТоз участвует в защите как от бактериальной, так и грибковой инфекции. У пациентов с выраженным НЕТозом грибковый кератит протекал значительно легче [73], однако НЕТоз осложнял течение кератита, вызванного клиническими изолятами *P. aeruginosa* в мышиной модели [74]. В случае стерильного воспаления роговицы при синдроме сухого глаза также наблюдалось накопление NET [75]. Одной из причин НЕТоза могла быть повышенная осмолярность слёзной жидкости, омывающей роговицу [76]. Для синдрома сухого глаза, который часто возникает как проявление реакции «трансплантат против хозяина» при пересадках костного мозга [77], и для аутоиммунного синдрома Шегрена [78] также характерно накопление NET в слёзной жидкости. Интересно, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (в составе глазных капель «Визомитин») доказал свою высокую эффективность при терапии синдрома сухого глаза различной этиологии [79]. Можно полагать, что этот эффект SkQ1 отчасти связан с обнаруженным нами подавлением НЕТоза [16].

Роль НЕТоза в тромбообразовании. НЕТоз играет важную роль в патогенезе тромбозов различного происхождения [80, 81]. Так, например, в модели стеноза нижней полой вены у мышей с нокаутом гена *PAD4* вероятность тромбоза была значительно снижена [82]. Участие НЕТоза в тромбозе определяется взаимодействием NET с эндотелием и тромбоцитами, а также задержкой мелких тромбов. НЕТоз, по-видимому, определяет тромбоз, связанный с избыточными реакциями врожденного иммунитета («иммунотромбоз») [83]. Иммунотромбоз, предположительно, является защитной реакцией организма на патогены, облегчающей их захват в фибриновом сгустке. Кроме того, тромбы мелких сосудов могут создавать отсеки, где патогены могут быть эффективно уничтожены. При этом последствия такой реакции могут быть трагическими. Недавнее масштабное клиническое исследование выявило корреляцию между уровнем НЕТоза и тяжестью ишемического инсульта и инфаркта миокарда [84]. НЕТоз может активироваться микрокристаллами холестерина и участвовать в патогенезе атеросклероза. Гистоны в составе NET вызывают TLR4-зависимую активацию макрофагов и выброс цитокинов, активирующих Т-хелперные клетки (Th17) [85, 86]. Воспалительный процесс в бляшках может служить одной из причин тромбоза. Еще одной причиной тромбоза могут быть онкологические заболевания, и НЕТоз, предположительно, участвует в тромбообразовании [87]. С другой стороны, терапевтическое вирусное инфицирование опухолей индуцирует нейтрофил-зависимую внутриопухолевую коагуляцию и гибель раковых клеток. Однако предстоит еще выяснить, действительно ли этот процесс обусловлен НЕТозом [88]. Тромбоз, характерный для различных вирусных инфекций, может быть связан с избыточным НЕТозом, и, по-видимому, участвует в патогенезе COVID-19 (см. ниже).

В протоках поджелудочной железы НЕТоз может быть вызван микрокристаллами карбоната кальция, что ведет к закупорке панкреатического протока и панкреатиту [89]. Подобные кристаллы вызывают НЕТоз в желчных протоках и желчном пузыре, что может вести к образованию желчных камней [90].

Роль НЕТоза в развитии легочных заболеваний. В дыхательных путях НЕТоз вносит свой вклад в защиту от инфекции, повышая вязкость слизи и способствуя уничтожению патогенов, однако многие из них (в частности, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) вырабатывают эндонуклеазы, которые расщепляют NET и защищают себя от гибели [91]. Вместе с тем НЕТоз способствует развитию осложнений инфекционных заболеваний легких, таких как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), а также бронхиальная астма и др. Проведенное недавно (но до начала эпидемии COVID-19) клиническое исследование внебольничной пневмонии показало корреляцию содержания NET и тяжести заболевания [92]. Острое повреждение легких (ОПЛ) и более тяжелый ОРДС, обусловленные разнообразной этиологией, сопровождаются избыточным НЕТозом [93]. НЕТоз при этих патологиях может участвовать в повреждении альвеолярного эпителия и

эндотелия. Для ХОБЛ, которая, как правило, связана с курением и загрязнением воздуха, и тяжелой «нейтрофильной» астмы также характерно накопление NET в мокроте и смывах из дыхательных путей [94]. Риновирусная инфекция на фоне астмы значительно повышала содержание NET [95]. При астме образование хроматин-содержащих ловушек может происходить также при гибели эозинофилов, подобной НЕТозу [96].

Тяжелая острая респираторная инфекция COVID-19 (corona virus disease-19), вспыхнувшая в декабре 2019 г. в китайском городе Ухань и впоследствии переросшая в пандемию, поразила в настоящее время более 15 млн человек из 250 стран мира. Заболевание было вызвано новым коронавирусом, названным SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), и сопровождалось вирусной пневмонией, часто прогрессирующей в ОРДС и полиорганную недостаточность. Повышенный уровень нейтрофилов в крови указывает на тяжесть этого заболевания и плохой прогноз [97]. При обследовании пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, в крови был обнаружен повышенный уровень маркеров НЕТоза (свободной ДНК, комплексов МПО-ДНК и цитруллинированного гистона H3) и маркера гибели клеток лактатдегидрогеназы [98]. Концентрация свободной ДНК коррелировала с содержанием нейтрофилов, с уровнем маркера острой фазы воспаления *C*-реактивным белком и маркером тромбоза D-димером. Сыворотки пациентов с COVID-19 индуцировали НЕТоз у здоровых доноров в системе *in vitro*. Одним из проявлений COVID-19 является встречающийся у детей синдром Кавасаки (васкулит), для которого характерен избыточный НЕТоз [99]. НЕТоз при COVID-19 может быть вызван эпителиальными и эндотелиальными клетками, пораженными вирусом, активированными тромбоцитами и воспалительными цитокинами. В то же время избыточный НЕТоз участвует в развитии «цитокинового шторма» и тромбоза, которые являются основной причиной тяжелого течения COVID-19 [100].

НЕТоз и аутоиммунные заболевания. Многие компоненты NET, в частности, двуспиральная ДНК, белки гранул и гистоны, вызывают выработку антител и могут стимулировать развитие аутоиммунных заболеваний. Впервые участие НЕТоза в патогенезе аутоиммунных заболеваний было детально исследовано на примере системной красной волчанки [101]. При этом заболевании в крови появляется особая форма гранулоцитов, названная «гранулоциты низкой плотности». Эти клетки вырабатывают больше воспалительных цитокинов (включая интерфероны I типа) и значительно легче входят в НЕТоз, чем нормальные нейтрофилы. Их NET содержат больше аутоантигенов и окисленной митохондриальной ДНК [33], что делает их более сильными иммуностимуляторами. Одной из особенностей гранулоцитов низкой плотности является усиленная продукция митохондриальных АФК. Недавно было показано, что митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ (сходный по структуре с SkQ1) подавляет НЕТоз и патологические проявления в мышиной модели системной красной волчанки [102].

При ревматоидном артрите (РА) развитие патологии коррелировало с накоплением маркеров NET, комплексов ДНК с МПО и антител к цитруллинированным гистонам [103, 104]. Кроме того, на модели РА было установлено, что поглощение NET фибробластами стимулировало образование антител против цитруллинированных гистонов [105]. Подобные наблюдения свидетельствуют об участии НЕТоза в таких аутоиммунных заболеваниях, как васкулит, ассоциированный с «антителами против нейтрофилов» (AAV), антифосфолипидный синдром, рассеянный склероз и псориаз [106]. Интересно, что при некоторых заболеваниях НЕТоз может играть антивоспалительную роль. Так, при падагре НЕТоз, индуцированный кристаллами мочевой кислоты, сопровождается выбросом литических ферментов, которые расщепляют провоспалительные цитокины в очаге воспаления. Предполагается, что НЕТоз при подагре предотвращает развитие хронического заболевания [107].

ТЕРАПИЯ НЕТоза

Выявленное участие НЕТоза в различных патологиях привело к интенсивному изучению и испытаниям различных терапевтических подходов. Одна их часть включает применение средств, препятствующих НЕТозу. К ней относится антицитокиновая терапия, направленная на предотвращение накопления нейтрофилов в очагах поражения и их активацию, а также применение ингибиторов компонентов программы НЕТоза: НЭ, PAD4 и GSDMD. Другая часть связана с подходами, направленными на разрушение NET или ослабление их повреждающего действия. Антицитокиновая терапия, направленная против IL-1β, широко используется при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Одной из её мишеней может являться избыточный НЕТоз. Рекомбинантный белок *Анакинра*, антагонист рецептора IL-1β, в

настоящее время проходит клинические испытания при COVID-19 (https://clinicaltrials.gov: NCT04324021, NCT04330638, NCT02735707). Из ингибиторов НЕТоза наиболее далеко продвинулись испытания ингибиторов НЭ. Первый из них, *сивелестат*, был разрешен к применению при ОРДС в Японии и Южной Корее, но мета-анализ клинических данных не подтвердил его эффективность [108]. Новое поколение ингибиторов НЭ в настоящее время находится лишь на первой стадии клинических испытаний. Ингибиторы GSDMD и PAD4 находятся на доклинической стадии разработки. Большой интерес представляет использование существующих лекарственных препаратов. Так, *дисульфирам*, который используется для лечения алкоголизма, ингибирует GSDMD и защищает мышей от гибели в модели сепсиса, вызванного ЛПС [109]. Надо отметить, что GSDMD является также критическим компонентом программы пироптоза, и авторы исследования связывают его эффект с предотвращением пироптоза макрофагов. Эксперименты *in vitro* показали, что НЕТоз предотвращается ингибиторами микротрубочек [47]. К этой группе препаратов относится *колхицин*, и в настоящее время ведутся клинические испытания колхицина при COVID-19 (https://clinicaltrials.gov: NCT04326790, NCT04328480, NCT04322565, NCT04322682).

Среди препаратов, направленных на разрушение NET, наиболее детально исследованы ДНКаза I и антитела против гистонов. Рекомбинантная ДНКаза I была успешно использована практически во всех моделях патологий, сопряженных с НЕТозом. В частности, введение ДНКазы I значительно облегчает течение ОРДС [93] и ХОБЛ [94] в моделях на животных. У пациентов с муковисцидозом ингаляция ДНКазы улучшала функцию легких, а нейтрофильная эластаза способствовала растворению мокроты, делая её более доступной для ДНКазы [110]. Клинические испытания актин-резистентной ДНКазы (PRX-110) проходят вторую фазу и дают обнадеживающие результаты (https://clinicaltrials.gov: NCT02605590, NCT02722122). Можно надеяться, что ДНКаза будет не только разжижать мокроту, но и сможет препятствовать развитию ОРДС, как это наблюдалось в экспериментах на животных.

Наши эксперименты с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 показали его потенциальную эффективность против НЕТоза [16]. В модели системного воспалительного синдрома на мышах SkQ1 предотвращал летальное действие воспалительного цитокина TNF [111]. Сходный по структуре с SkQ1 антиоксидант MitoQ также подавлял НЕТоз в мышиной модели системной красной волчанки [102]. Эти результаты позволяют надеяться на то, что на основе митохондриально-направленных антиоксидантов могут быть созданы препараты для терапии болезней, связанных с избыточным НЕТозом и, в частности, с COVID-19.

Программа образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НЕТоз) изучается с высокой интенсивностью, однако многие вопросы относительно его механизмов и физиологической роли остаются открытыми. Прежде всего, это относится к сигнальным механизмам инициации НЕТоза. В частности, остаются неясными процессы, ведущие к модификации хроматина и его деконденсации. Не определены пока мишени для действия мтАФК и детали мтАФК-зависимой активации NADPH-оксидазы. Предполагается, что избыточный НЕТоз играет важную роль в патогенезе многих инфекционных, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, но доказательств этому пока собрано недостаточно. Новый толчок к изучению патофизиологической роли НЕТоза может быть связан с его предполагаемой ролью в патогенезе COVID-19. Разработка новых лекарственных средств, предотвращающих НЕТоз, включая митохондриально-направленные антиоксиданты, представляется перспективным направлением фармакологических исследований.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ О.Ю.Плетюшкиной, И.И.Галкину, С.А.Голышеву, Р.А.Зиновкину и А.С.Приходько, принявших активное участие в экспериментальной работе, посвященной изучению НЕТоза, дегрануляции и окислительного взрыва нейтрофилов человека. Мы также от всего сердца благодарим Владимира Петровича Скулачева, который инициировал наши работы в области митохондриологии, и поздравляем нашего дорогого учителя с 85-летним юбилеем.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-00-00088).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996) Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis, *J. Leukoc. Biol.*, **59**, 229-240, doi: 10.1002/jlb.59.2.229.
2. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, **303**, 1532-1535, doi: 10.1126/science.1092385.
3. Steinberg, B. E., and Grinstein, S. (2007) Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death, *Sci. STKE*, **379**, pe11, doi: 10.1126/stke.3792007pe11.
4. Vorobjeva, N. V., and Pinegin, B. V. (2014) Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1286-1296, doi: 10.1134/S0006297914120025.
5. Ravindran, M., Khan, M. A., and Palaniyar, N. (2019) Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology, *Biomolecules*, **9**, 365, doi: 10.3390/biom9080365.
6. Yousefi, S., Simon, D., Stojkov, D., Karsonova, A., Karaulov, A., and Simon, H. U. (2020) *In vivo* evidence for extracellular DNA trap formation, *Cell Death Dis.*, **11**, 300, doi: 10.1038/s41419-020-2497-x.
7. Rada, B. (2017) Neutrophil extracellular traps and microcrystals, *J. Immunol. Res.*, **2017**, 2896380, doi: 10.1155/2017/2896380.
8. Pinegin, B., Vorobjeva, N., and Pinegin, V. (2015) Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.*, **14**, 633-640, doi: 10.1016/j.autrev.2015.03.002.
9. Remijsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation, *Cell Res.*, **21**, 290-304, doi: 10.1038/cr.2010.150.
10. Germic, N., Stojkov, D., Oberson, K., Yousefi, S., Simon, H. U. (2017) Neither eosinophils nor neutrophils require ATG5-dependent autophagy for extracellular DNA trap formation, *Immunology*, **152**, 517-525, doi: 10.1111/imm.12790.
11. Desai, J., Kumar, S. V., Mulay, S. R., Konrad, L., Romoli, S., et al. (2016) PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling, *Eur. J. Immunol.*, **46**, 223-229, doi: 10.1002/eji.201545605.
12. Schreiber, A., Rousselle, A., Becker, J. U., von Mässenhausen, A., Linkermann, A., and Kettritz, R. (2017) Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9618-E9625, doi: 10.1073/pnas.1708247114.
13. D'Cruz, A. A., Speir, M., Bliss-Moreau, M., Dietrich, S., Wang, S., et al. (2018) The pseudokinase MLKL activates PAD4-dependent NET formation in necroptotic neutrophils, *Sci. Signal.*, **11**, eaao1716, doi: 10.1126/scisignal.aao1716.
14. Pinegin, B., Vorobjeva, N., Pashenkov, M., and Chernyak, B. (2018) The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 3745-3754, doi: 10.1002/jcp.26117.
15. Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017) Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*, *Eur. J. Cell. Biol.*, **96**, 254-265, doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003.
16. Vorobjeva, N., Galkin, I., Pletjushkina, O., Golyshev, S., Zinovkin, R., Prikhodko, A., Pinegin, V., Kondratenko, I., Pinegin, B., and Chernyak, B. (2020) Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*, **1866**, 165664, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165664.
17. Von Köckritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., and Medina, E. (2008) Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation, *Blood*, **111**, 3070-3080, doi: 10.1182/blood-2007-07-104018.
18. Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A. F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H. U., and Yousefi, S. (2014) NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils, *J. Immunol.*, **192**, 5314-5323, doi: 10.4049/jimmunol.1303418.
19. Granger, V., Faille, D., Marani, V., Noël, B., Gallais, Y., Szely, N., Flament, H., Pallardy, M., Chollet-Martin, S., and de Chaisemartin, L. (2017) Human blood monocytes are able to form extracellular traps, *J. Leukoc. Biol.*, **102**, 775-781, doi: 10.1189/jlb.3MA0916-411R.
20. Chow, O. A., von Köckritz-Blickwede, M., Bright, A. T., Hensler, M. E., Zinkernagel, A. S., Cogen, A. L., Gallo, R. L., Monestier, M., Wang, Y., Glass, C. K., and Nizet, V. (2010) Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps, *Cell. Host Microbe*, **8**, 445-454, doi: 10.1016/j.chom.2010.10.005.
21. Zhang, X., Zhuchenko, O., Kuspa, A., and Soldati, T. (2016) Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets, *Nat. Commun.*, **7**, 10938, doi: 10.1038/ncomms10938.
22. Hawes, M., Allen, C., Turgeon, B. G., Curlango-Rivera, G., Minh Tran, T., Huskey, D. A., and Xiong, Z. (2016) Root border cells and their role in lant defense, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **54**, 143-161, doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100140.
23. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J. Cell. Biol.*, **176**, 231-241, doi: 10.1083/jcb.200606027.
24. Lu, D. J., Furuya, W., and Grinstein, S. (1993) Involvement of multiple kinases in neutrophil activation, *Blood Cells*, **19**, 343-351.
25. Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., and Waldmann, H. (2011) Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 75-77, doi: 10.1038/nchembio.496.
26. Fonseca, Z., Díaz-Godínez, C., Mora, N., Alemán, O. R., Uribe-Querol, E., Carrero, J. C., and Rosales, C. (2018). Entamoeba histolytica induce signaling via Raf/MEK/ERK for neutrophil extracellular trap (NET) formation, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **8**, 226, doi: 10.3389/fcimb.2018.00226.
27. Steinberg, S. F. (2015) Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C, *Front. Pharmacol.*, **6**, 128, doi: 10.3389/fphar.2015.00128.
28. Trevelin, S. C., and Lopes, L. R. (2015) Protein disulfide isomerase and Nox: new partners in redox signaling, *Curr. Pharm. Des.*, **21**, 5951-5963, doi: 10.2174/1381612821666151029112523.

29. Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D. G., and Dikalov, S. I. (2010) Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension, *Circ. Res.*, **107**, 106-116, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214601.
30. Nazarewicz, R. R., Dikalova, A. E., Bikineyeva, A., and Dikalov, S. I. (2013) Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **305**, H1131-1140, doi: 10.1152/ajpheart.00063.2013.
31. Kröller-Schön, S., Steven, S., Kossmann, S., Scholz, A., Daub, S., et al. (2014) Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 247-266, doi: 10.1089/ars.2012.4953.
32. Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2015) SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2817-2822, doi: 10.1073/pnas.1414055112.
33. Lood, C., Blanco, L. P., Purmalek, M. M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S. S., et al. (2016) Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease, *Nat. Med.*, **22**, 146-153, doi: 10.1038/nm.4027.
34. Kenny, E. F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., Brinkmann, V., Bernuth, H. V., and Zychlinsky, A. (2017) Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways, *Elife*, **6**, pii: e24437, doi: 10.7554/eLife.24437.
35. Vorobjeva, N. V., and Chernyak, B. V. (2020) NADPH oxidase modulates Ca^{2+}-dependent formation of neutrophil extracellular traps, *Vestn. Mosk. Univ. Ser. 16. Biol.*, **75** (in press).
36. Tintinger, G. R., Theron, A. J., Steel, H. C., and Anderson, R. (2001) Accelerated calcium influx and hyperactivation of neutrophils in chronic granulomatous disease, *Clin. Exp. Immunol.*, **123**, 254-263, doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01447.x.
37. Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., and Lippe, G. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology, *Physiol. Rev.*, **95**, 1111-1155, doi: 10.1152/physrev.00001.2015.
38. Dumas, J. F., Argaud, L., Cottet-Rousselle, C., Vial, G., Gonzalez, C., Detaille, D., Leverve, X., and Fontaine, E. (2009) Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells, *J. Biol. Chem.*, **284**, 15117-15125, doi: 10.1074/jbc.M900926200.
39. Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 619-642, doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.619.
40. Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., and Korsmeyer, S. J. (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis, *Dev. Cell*, **2**, 55-67, doi: 10.1016/S1534-5807(01)00116-2.
41. Griffiths, E. J., and Halestrap, A. P. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion, *Biochem. J.*, **307**, 93-98, doi: 10.1042/bj3070093.
42. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., and Papayannopoulos, V. (2014) A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis, *Cell. Rep.*, **8**, 883-896, doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.044.
43. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps, *J. Cell. Biol.*, **191**, 677-691, doi: 10.1083/jcb.201006052.
44. Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity, *Blood*, **117**, 953-959, doi: 10.1182/blood-2010-06-290171.
45. Repnik, U., Hafner Česen, M., and Turk, B. (2014) Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges, *Mitochondrion*, **19 Pt. A**, 49-57, doi: 10.1016/j.mito.2014.06.006.
46. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps, *J. Exp. Med.*, **207**, 1853-1862, doi: 10.1084/jem.20100239.
47. Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S., and Radic, M. (2009) Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils, *J. Innate Immun.*, **1**, 194-201, doi: 10.1159/000206974.
48. Amulic, B., Knackstedt, S. L., Abu Abed, U., Deigendesch, N., Harbort, C. J., Caffrey, B. E., Brinkmann, V., Heppner, F. L., Hinds, P. W., and Zychlinsky, A. (2017) Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps, *Dev. Cell*, **43**, 449-462.e5, doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.013.
49. Kambara, H., Liu, F., Zhang, X., Liu, P., Bajrami, B., Teng, Y., Zhao, L., Zhou, S., Yu, H., Zhou, W., Silberstein, L. E., Cheng, T., Han, M., Xu, Y., and Luo, H. R. (2018) Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death, *Cell Rep.*, **22**, 2924-2936, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.067.
50. Sollberger, G., Choidas, A., Burn, G. L., Habenberger, P., Di Lucrezia, R., Kordes, S., Menninger, S., Eickhoff, J., Nussbaumer, P., Klebl, B., Krüger, R., Herzig, A., and Zychlinsky, A. (2018) Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps, *Sci. Immunol.*, **3**, eaar6689, doi: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
51. Chen, K. W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N. D., von Pein, J. B., Broz, P., Sweet, M. J., and Schroder, K. (2018) Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps, *Sci. Immunol.*, **3**, eaar6676, doi: 10.1126/sciimmunol.aar6676.
52. Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., and Alnemri, E. S. (2017) Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death, *Nat. Commun.*, **8**, 14128, doi: 10.1038/ncomms14128.
53. Rogers, C., Erkes, D. A., Nardone, A., Aplin, A. E., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2019) Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation, *Nat. Commun.*, **10**, 1689, doi: 10.1038/s41467-019-09397-2.
54. Maueröder, C., Mahajan, A., Paulus, S., Gößwein, S., Hahn, J., Kienhöfer, D., Biermann, M. H., Tripal, P., Friedrich, R. P., Munoz, L. E., Neurath, M. F., Becker, C., Schett, G. A., Herrmann, M., and Leppkes, M. (2016) Ménage-à-Trois: the ratio of bicarbonate to CO_2 and the pH regulate the capacity of neutrophils to form NETs, *Front. Immunol.*, **7**, 583, doi: 10.3389/fimmu.2016.00583.
55. Naah de Souza, C., Breda, L. C. D., Khan, M. A., de Almeida, S. R., Câmara, N. O. S., Sweezey, N., and

Palaniyar, N. (2017) Alkaline pH promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: a matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone, *Front. Immunol.*, **8**, 1849, doi: 10.3389/fimmu.2017.01849.
56. Behnen, M., Möller, S., Brozek, A., Klinger, M., and Laskay, T. (2017) Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps, *Front. Immunol.*, **8**, 184, doi: 10.3389/fimmu.2017.00184.
57. Lodge, K. M., Cowburn, A. S., Li, W., and Condliffe, A. M. (2020) The impact of hypoxia on neutrophil degranulation and consequences for the host, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1183, doi: 10.3390/ijms21041183.
58. Branitzki-Heinemann, K., Möllerherm, H., Völlger, L., Husein, D. M., de Buhr, N., Blodkamp, S., Reuner, F., Brogden, G., Naim, H. Y., and von Köckritz-Blickwede, M. (2016) Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level, *Front. Immunol.*, **7**, 518, doi: 10.3389/fimmu.2016.00518.
59. Nadesalingam, A., Chen, J. H. K., Farahvash, A., Khan, M. A. (2018) Hypertonic saline suppresses NADPH oxidase-dependent neutrophil extracellular trap formation and promotes apoptosis, *Front. Immunol.*, **9**, 359, doi: 10.3389/fimmu.2018.00359.
60. Domingo-Gonzalez, R., Martínez-Colón, G. J., Smith, A. J., Smith, C. K., Ballinger, M. N., Xia, M., Murray, S., Kaplan, M. J., Yanik, G. A., and Moore, B. B. (2016) Inhibition of neutrophil extracellular trap formation after stem cell transplant by prostaglandin E2, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **193**, 186-197, doi: 10.1164/rccm.201501-0161OC.
61. Shishikura, K., Horiuchi, T., Sakata, N., Trinh, D. A., Shirakawa, R., Kimura, T., Asada, Y., and Horiuchi, H. (2016) Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP, *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 319-331, doi: 10.1111/bph.13373.
62. Healy, L. D., Puy, C., Fernández, J. A., Mitrugno, A., Keshari, R. S., Taku, N. A., Chu, T. T., Xu, X., Gruber, A., Lupu, F., Griffin, J. H., and McCarty, O. J. T. (2017) Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation *in vitro* and activation *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 8616-8629, doi: 10.1074/jbc.M116.768309.
63. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., and Akira, S. (2012) Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1, *Cell Host Microbe*, **12**, 109-116, doi: 10.1016/j.chom.2012.05.015.
64. Yost, C. C., Schwertz, H., Cody, M. J., Wallace, J. A., Campbell, R. A., et al. (2016) Neonatal NET-inhibitory factor and related peptides inhibit neutrophil extracellular trap formation, *J. Clin. Invest.*, **126**, 3783-3798, doi: 10.1172/JCI83873.
65. Hahn, S., Giaglis, S., Chowdhury, C. S., Hösli, I., and Hasler, P. (2013) Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology, *Semin. Immunopathol.*, **35**, 439-453, doi: 10.1007/s00281-013-0380-x.
66. Hu, S., Liu, X., Gao, Y., Zhou, R., Wei, M., Dong, J., Yan, H., and Zhao, Y. (2019) Hepatitis B virus inhibits neutrophil extracellular trap release by modulating reactive oxygen species production and autophagy, *J. Immunol.*, **202**, 805-815, doi: 10.4049/jimmunol.1800871.
67. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death 2018, *Cell. Death Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
68. Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., et al. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat. Med.*, **13**, 463-469, doi: 10.1038/nm1565.
69. Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., et al. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*, *Nat. Med.*, **18**, 1386-1393, doi: 10.1038/nm.2847.
70. Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G. J., and Simon, H. U. (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense, *Nat. Med.*, **14**, 949-953, doi: 10.1038/nm.1855.
71. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H. U. (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps, *Cell Death Dis.*, **16**, 1438-1444, doi: 10.1038/cdd.2009.96.
72. Ingelsson, B., Söderberg, D., Strid, T., Söderberg, A., Bergh, A. C., Loitto, V., Lotfi, K., Segelmark, M., Spyrou, G., and Rosén, A. (2018) Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E478-E487, doi: 10.1073/pnas.1711950115.
73. Jin, X., Zhao, Y., Zhang, F., Wan, T., Fan, F., Xie, X., and Lin, Z. (2016) Neutrophil extracellular traps involvement in corneal fungal infection, *Mol. Vis.*, **22**, 944-952.
74. Shan, Q., Dwyer, M., Rahman, S., and Gadjeva, M. (2014) Distinct susceptibilities of corneal Pseudomonas aeruginosa clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity, *Infect. Immun.*, **82**, 4135-4143, doi: 10.1128/IAI.02169-14.
75. Sonawane, S., Khanolkar, V., Namavari, A., Chaudhary, S., Gandhi, S., et al. (2012) Ocular surface extracellular DNA and nuclease activity imbalance: a new paradigm for inflammation in dry eye disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, 8253-8263, doi: 10.1167/iovs.12-10430.
76. Tibrewal, S., Ivanir, Y., Sarkar, J., Nayeb-Hashemi, N., Bouchard, C. S., Kim, E., and Jain, S. (2014) Hyperosmolar stress induces neutrophil extracellular trap formation: implications for dry eye disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 7961-7969, doi: 10.1167/iovs.14-15332.
77. An, S., Raju, I., Surenkhuu, B., Kwon, J. E., Gulati, S., Karaman, M., Pradeep, A., Sinha, S., Mun, C., and Jain, S. (2019) Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to pathological changes of ocular graft-vs.-host disease (oGVHD) dry eye: Implications for novel biomarkers and therapeutic strategies, *Ocul. Surf.*, **17**, 589-614, doi: 10.1016/j.jtos.2019.03.010.
78. De Bont, C. M., Stokman, M. E. M., Faas, P., Thurlings, R. M., Boelens, W. C., Wright, H. L., and Pruijn, G. J. (2020) Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis, *J. Autoimmun.*, 102484, doi: 10.1016/j.jaut.2020.102484.
79. Brzheskiy, V. V., Efimova, E. L., Vorontsova, T. N., Alekseev, V. N., Gusarevich, O. G., et al. (2015) Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome, *Adv. Ther.*, **32**, 1263-1279, doi: 10.1007/s12325-015-0273-6.
80. Martinod, K., and Wagner, D. D. (2014) Thrombosis: tangled up in NETs, *Blood*, **123**, 2768-2776, doi: 10.1182/blood-2013-10-463646.
81. Moschonas, I. C., and Tselepis, A. D. (2019) The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis, *Atherosclerosis*, **288**, 9-16, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.919.

82. Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T. A., Wong, S. L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., and Wagner, D. D. (2013) Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 8674-8679, doi: 10.1073/pnas.1301059110.
83. Zucoloto, A. Z., and Jenne, C. N. (2019) Platelet-neutrophil interplay: insights into neutrophil extracellular trap (NET)-driven coagulation in infection, *Front. Cardiovasc. Med.*, **6**, 85, doi: 10.3389/fcvm.2019.00085.
84. Novotny, J., Oberdieck, P., Titova, A., Pelisek, J., Chandraratne, S., et al. (2020) Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction, *Neurology*, **94**, e2346-e2360, doi: 10.1212/WNL.0000000000009532.
85. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015) Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis, *Science*, **349**, 316-320, doi: 10.1126/science.aaa8064.
86. Tsourouktsoglou, T. D., Warnatsch, A., Ioannou, M., Hoving, D., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2020) Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4, *Cell Rep.*, **31**, 107602, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107602.
87. Snoderly, H. T., Boone, B. A., and Bennewitz, M. F. (2019) Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment, *Breast Cancer Res.*, **21**, 145, doi: 10.1186/s13058-019-1237-6.
88. Breitbach, C. J., De Silva, N. S., Falls, T. J., Aladl, U., Evgin, L., et al. (2011) Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus, *Mol. Ther.*, **19**, 886-894, doi: 10.1038/mt.2011.26.
89. Leppkes, M., Maueroder, C., Hirth, S., Nowecki, S., Gunther, C., et al. (2016) Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis, *Nat. Commun.*, **7**, 10973, doi: 10.1038/ncomms10973.
90. Muñoz, L. E., Boeltz, S., Bilyy, R., Schauer, C., Mahajan, A., et al. (2019) Neutrophil extracellular traps initiate gallstone formation, *Immunity*, **51**, 443-450.e4, doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.002.
91. Twaddell, S. H., Baines, K. J., Grainge, C., and Gibson, P. G. (2019) The emerging role of neutrophil extracellular traps in respiratory disease, *Chest*, **156**, 774-782, doi: 10.1016/j.chest.2019.06.012.
92. Ebrahimi, F., Giaglis, S., Hahn, S., Blum, C. A., Baumgartner, C., Kutz, A., van Breda, S. V., Mueller, B., Schuetz, P., Christ-Crain, M., and Hasler, P. (2018) Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial, *Eur. Respir. J.*, **51**, 1701389, doi: 10.1183/13993003.01389-2017.
93. Vassallo, A., Wood, A. J., Subburayalu, J., Summers, C., and Chilvers, E. R. (2019) The counter-intuitive role of the neutrophil in the acute respiratory distress syndrome, *Br. Med. Bull.*, **131**, 43-55, doi: 10.1093/bmb/ldz024.
94. Uddin, M., Watz, H., Malmgren, A., and Pedersen, F. (2019) NETopathic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and severe asthma, *Front. Immunol.*, **10**, 47, doi: 10.3389/fimmu.2019.00047.
95. Toussaint, M., Jackson, D. J., Swieboda, D., Guedan, A., Tsourouktsoglou, T. D., et al. (2017). Host DNA released by NETosis promotes rhinovirusinduced type-2 allergic asthma exacerbation, *Nat. Med.*, **23**, 681-691, doi: 10.1038/nm.4332.
96. Choi, Y., Pham, D., Lee, D.-H., Lee, S.-H., Kim, S.-H., and Park, H.-S. (2018) Biological function of eosinophil extracellular traps in patients with severe eosinophilic asthma, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 104, doi: 10.1038/s12276-018-0136-8.
97. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., and Manson, J. J., HLH Across Speciality Collaboration, UK (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet*, **395**, 1033-1034, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
98. Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C. N., Weber, A., Barnes, B. J., Egeblad, M., Woods, R. J., Kanthi, Y., and Knight, J. S. (2020) Neutrophil extracellular traps in COVID-19, *JCI insight*, 138999. Advance online publication, doi: 10.1172/jci.insight.138999.
99. Yoshida, Y., Takeshita, S., Kawamura, Y., Kanai, T., Tsujita, Y., and Nonoyama, S. (2020) Enhanced formation of neutrophil extracellular traps in Kawasaki disease, *Pediatr. Res.*, **87**, 998-1004, doi: 10.1038/s41390-019-0710-3.
100. Barnes, B. J., Adrover, J. M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A., Cools-Lartigue, J., et al. (2020) Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps, *J. Exp. Med.*, **217**, e20200652, doi: 10.1084/jem.20200652.
101. Gupta, S., and Kaplan, M. J. (2016) The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases, *Nat. Rev. Nephrol.*, **12**, 402-413, doi: 10.1038/nrneph.2016.71.
102. Fortner, K. A., Blanco, L. P., Buskiewicz, I., Huang, N., Gibson, P. C., et al. (2020) Targeting mitochondrial oxidative stress with MitoQ reduces NET formation and kidney disease in lupus-prone MRL-lpr mice, *Lupus Sci. Med.*, **7**, e000387, doi: 10.1136/lupus-2020-000387.
103. Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., et al. (2013) NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulateinflammatory responses in rheumatoid arthritis, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 178ra40, doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.
104. Wang, W., Peng, W., and Ning, X. (2018) Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis, *Int. J. Rheum. Dis.*, **21**, 415-421, doi: 10.1111/1756-185X.13226.
105. Carmona-Rivera, C., Carlucci, P. M., Moore, E., Lingampalli, N., Uchtenhagen, H., et al. (2017) Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis, *Sci. Immunol.*, **2**, eaag3358, doi: 10.1126/sciimmunol.aag3358.
106. Fousert, E., Toes, R., and Desai, J. (2020) Neutrophil extracellular traps (NETs) take the central stage in driving autoimmune responses, *Cells*, **9**, 915, doi: 10.3390/cells9040915.
107. Schauer, C., Janko, C., Munoz, L. E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., et al. (2014) Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines, *Nat. Med.*, **20**, 511-517, doi: 10.1038/nm.3547.
108. Tagami, T., Tosa, R., Omura, M., Fukushima, H., Kaneko, T., et al. (2014) Effect of a selective neutrophil elastase inhibitor on mortality and ventilator-free days in patients with increased extravascular lung water: a post hoc analysis of the PiCCO pulmonary edema study, *J. Intensive Care*, **2**, 67, doi: 10.1186/s40560-014-0067-y.
109. Hu, J. J., Liu, X., Xia, S., Zhang, Z., Zhang, Y., et al. (2020) FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation, *Nat. Immunol.*, **21**, 736-745, doi: 10.1038/s41590-020-0669-6.

110. Papayannopoulos, V., Staab, D., and Zychlinsky, A. (2011) Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy, *PLoS One*, **6**, e28526, doi: 10.1371/journal.pone.0028526.
111. Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Galkin, I. I., Zinovkin, R. A., Chernyak, B. V., Krysko, D. V., Bachert, C., Krysko, O., Skulachev, V. P., and Popova, E. N. (2017) Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, **1863**, 968-977, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.024.

NETosis: MOLECULAR MECHANISMS, ROLE IN PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

Review

N. V. Vorobjeva[1]* and B. V. Chernyak[2]

[1] *Lomonosov Moscow State University, Biology Faculty, 119991 Moscow, Russia; E-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

[2] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received June 20, 2020
Revised July 16, 2020
Accepted July 16, 2020

NETosis is a program for formation of neutrophil extracellular traps (NETs), which consist of modified chromatin decorated with bactericidal proteins from granules and cytoplasm. Various pathogens, antibodies and immune complexes, cytokines, microcrystals, and other physiological stimuli can cause NETosis. Induction of NETosis depends on reactive oxygen species (ROS), the main source of which is NADPH oxidase. Activation of NADPH oxidase depends on increase in the concentration of Ca^{2+} in the cytoplasm and in some cases on the generation of ROS in mitochondria. NETosis includes release of the granule components into the cytosol, modification of histones leading to chromatin decondensation, destruction of the nuclear envelope, as well as formation of pores in the plasma membrane. In this review, basic mechanisms of NETosis, as well as its role in the pathogenesis of some diseases including COVID-19 are discussed.

Keywords: neutrophil, neutrophil extracellular traps, NETosis, NADPH oxidase, reactive oxygen species, mitochondrial pore, COVID-19

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1398 – 1410

УДК 577.24

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: НЕГАТИВНЫЙ РЕГУЛЯТОР АПОПТОЗА И ФАКТОР ОНКОГЕННОСТИ

Обзор

© 2020 А.В. Замараев[1], Б. Животовский[1,2], Г.С. Копеина[1]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119191 Москва, Россия; электронная почта: lirroster@gmail.com*

[2] *Каролинский институт, Департамент медицины окружающей среды, SE-171 77 Стокгольм, Швеция*

Поступила в редакцию 30.06.2020
После доработки 09.09.2020
Принята к публикации 09.09.2020

Нарушение процесса программируемой апоптотической гибели клеток тесно связано с этиологией различных заболеваний, включая рак. Постоянные вирусные инфекции способны вызывать некоторые виды новообразований. Для этого онкогенные вирусы манипулируют как внешним путем запуска апоптоза, так и внутренним, подавляя активность проапоптотических белков и сигнальных путей. Неадекватный иммунный надзор или подавление иммунного ответа способны индуцировать бесконтрольное размножение вируса и пролиферацию клеток хозяина. В данном обзоре представлены современные данные о механизмах подавления апоптотической гибели вирусами и их роль в онкогенезе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: онкогенные вирусы, апоптоз, онкологические заболевания.

DOI: 10.31857/S0320972520100073

ВВЕДЕНИЕ

В многоклеточных организмах процесс апоптотической гибели играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, морфогенеза, а также задействован на разных этапах развития и функционирования иммунной системы и удалении поврежденных или инфицированных клеток [1]. Запуск апоптоза осуществляется посредством внеклеточных или внутриклеточных факторов, таких как активация рецепторов смерти, нарушение сигналов клеточного цикла, накопление неправильно свернутых белков, повреждение ДНК, метаболические нарушения, а также в ответ на различные бактериальные и вирусные инфекции.

Выделяют два основных пути передачи сигнала апоптоза: внешний путь (рецептор-зависимый сигнальный путь с участием рецепторов смерти) и внутренний путь (митохондриальный). Внешний путь клеточной гибели начинается с взаимодействия специфических лигандов гибели с рецепторами смерти (CD95, TRAIL-R1/2, TNFR1) на поверхности клетки. Лиганды, взаимодействующие с рецепторами, вызывают их олигомеризацию или конформационные изменения рецептора, что способствует присоединению белков-адаптеров (FADD, TRADD) и неактивных предшественников цистеиновых протеаз – инициаторных каспаз (прокаспаза-8, -10) [2]. В составе такого высокомолекулярного комплекса DISC происходит активация иници-

Принятые сокращения: AIF – фактор, индуцирующий апоптоз; Akt – протеинкиназа B; Apaf-1 – фактор активации апоптотической протеазы 1; Bcl-2 – семейство белков, регулирующих апоптоз; CD95/Fas/Apo-1 – рецептор смерти; cIAP– клеточный ингибитор белков апоптоза; DISC – сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную гибель; DREAM – белковый комплекс, ответственный за регулирование экспрессии генов клеточного цикла; EndoG – эндонуклеаза G; FADD – белок, взаимодействующий с доменом смерти CD95-рецептора; HBx – белок вируса гепатита Б; HTLV-1 – ретровирус Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа; KSHV – герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши; NF-kB – транскрипционный ядерный фактор каппа-Би; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; SARS-CoV – одноцепочечный РНК-вирус семейства короновирусов; TNF – фактор некроза опухолей; TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли 1; TRADD – белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора; TRAIL-R1/2 – рецептор, относящийся к семейству TNF, инициирующий апоптоз; АФК – активные формы кислорода; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека; ВПЧ – вирус папилломы человека; ВЭБ – вирус Эпштейна–Барра; дАТФ – 2′-дезоксинуклеозид-5′-трифосфат; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

* Адресат для корреспонденции.

аторных каспаз, которые вызывают, в свою очередь, активацию эффекторных каспаз (каспазы-3, -6, -7) [3]. Данный каспазный каскад приводит к гидролизу белков ядерной ламины, цитоскелета, протеин-киназ, белков репарации ДНК, а также инактивирует белки-ингибиторы апоптоза. В результате этих процессов происходят несовместимые с поддержанием нормального состояния биохимические и морфологические изменения клетки.

Внутриклеточные сигналы, такие как повреждение ДНК клетки, окислительный стресс, нарушение клеточного цикла или других сигнальных путей, приводят к апоптозу главным образом через внутренний путь. Ключевым событием внутреннего пути является пермеабилизация митохондриальной мембраны, обусловленное действием проапоптотических белков семейства Bcl-2, таких как Bax и Bak. Образование митохондриальных пор приводит к высвобождению из митохондрий в цитоплазму проапоптотических белков, таких как цитохром *c*, AIF, EndoG и др., через высокопроницаемые каналы на внешней поверхности митохондрий. Цитохром *c*, связываясь с белком Apaf-1 в присутствии дАТФ, вызывает его олигомеризацию, обеспечивая рекрутирование прокаспазы-9. Таким образом, в цитоплазме клетки формируется белковый комплекс под названием апоптосома. В составе этого комплекса происходит активация инициаторной каспазы-9, которая, в свою очередь, активирует эффекторные каспазы, приводя клетку к гибели [4].

Некоторые вирусные инфекции для репликации и выживания способны подавлять апоптотическую гибель клеток. Многие вирусы, в том числе и онкогенные, модулируют функции онкосупрессорного белка p53, активируют антиапоптотические сигнальные пути, ингибируют рецептор-зависимый и внутренний путь апоптоза, регулируя баланс про- и антиапоптотических факторов. Подобные изменения апоптотических путей приводят к нарушению гомеостатического баланса, что способствует прогрессированию инфекции и вирус-индуцированных патологий (таблица). Ниже представлены различные механизмы вирусных инфекций, участвующих в подавлении апоптоза, и их роль в трансформации клеток.

РЕГУЛЯЦИЯ ОНКОСУПРЕССОРНОГО БЕЛКА p53

Одним из центральных участников апоптотических сигнальных путей является онкосупрессорный белок p53. Этот транскрипционный фактор регулирует экспрессию ~500 целевых генов, тем самым контролируя широкий спектр клеточных процессов, включая остановку клеточного цикла, старение клеток, репарацию ДНК, метаболическую адаптацию и гибель клеток [18]. Многие вирусные инфекции, чтобы добиться успешной репликации и распространения, используют различные способы манипуляции функциями p53. Например, для экспансии

Виды опухоли, вызванные онкогенными вирусами [17]

Вирус	Вид опухоли	Ссылки
Вирус Эпштейна–Барра	40% лимфомы Ходжкина >95% эндемической лимфомы Беркитта 10% рак желудка большинство носоглоточной карциномы (тип II и III) саркома Капоши другие лимфомы	[5, 6]
Вирус гепатита B	53% гепатоцеллюлярной карциномы	[7]
Т-лимфотропный вирус человека 1	> 99% взрослого Т-клеточного лейкоза	[8, 9]
Вирус папилломы человека	> 95% рака шейки матки 70% рака ротоглотки другие аногенитальные карциномы	[10, 11]
Вирус гепатита C	25% гепатоцеллюлярной карциномы неходжкинские B-клеточные лимфомы	[12, 13]
Герпесвирус, связанный с саркомой Капоши	> 99% саркомы Капоши > 99% первичной выпотной лимфомы	[14]
Клеточный полиомавирус Меркеля	80% клеточной карциномы Меркеля	[15, 16]

некоторые вирусы вызывают p53-опосредованную апоптотическую гибель клеток хозяина, однако, некоторые вирусы могут стимулировать пролиферацию клеток, ослабляя функцию p53, регулирующую клеточный цикл, и тем самым могут провоцировать онкогенные процессы [19].

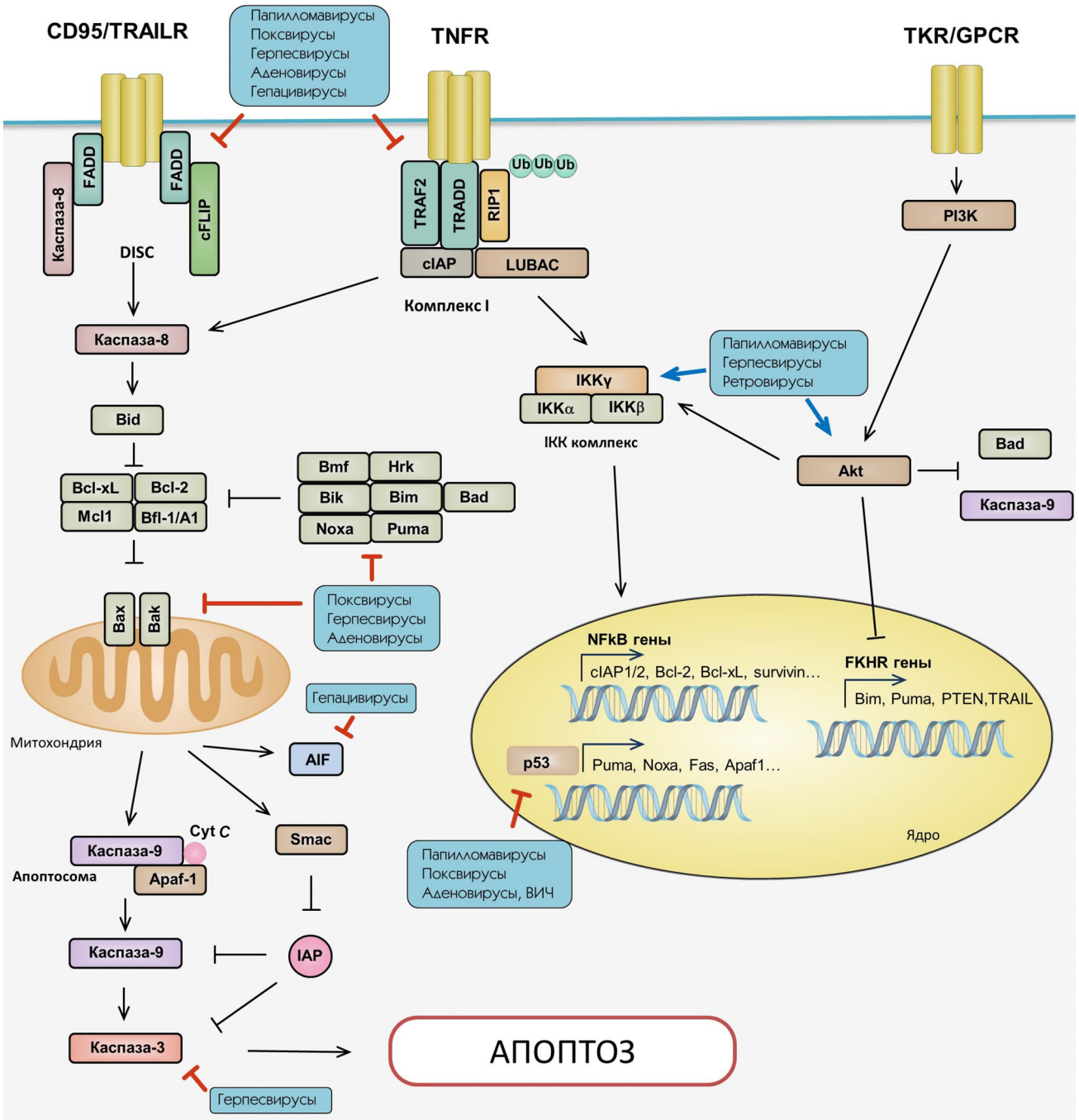
Одним из таких примеров является вирус гепатита B. Исследования этого вируса показали, что кодируемый им белок HBx (hepatitis B virus X protein) способен негативно влиять на запуск p53-индуцированного апоптоза [20]. На клеточных линиях гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и Hep3B была показана связь белка HBx с цитоплазматическим p53, а также с белком данного семейства p73. Данное взаимодействие предотвращало их ядерную транслокацию и запуск проапоптотических факторов. В дополнение к этому HBx усиливает экспрессию *N*-терминальной изоформы p73, которая является трансдоминантным ингибитором p53 [21]. Также HBx способен усиливать экспрессию белка HURP (hepatoma upregulated protein), который вызывает деградацию p53 и подавляет апоптоз, вызванный химиотерапевтическими ДНК-повреждающими агентами [22]. Таким образом, реактивация вируса гепатита B, которая довольно часто наблюдается при лечении гематологических злокачественных новообразований, химиотерапии рака молочной железы и других злокачественных опухолей, способна приводить к снижению ответа на лечение [23].

Наряду с исследованиями вируса гепатита B, многочисленные работы были проведены по изучению онкогенности вируса гепатита C. Было показано, что повышенная экспрессия белков вируса NS2, NS3/4A и NS5A способна влиять на p53-зависимый путь, индуцируя его перемещение из ядра в цитоплазматическую/перинуклеарную область. В частности, неструктурный белок NS5A напрямую взаимодействует с p53 и подавляет p53-индуцированный апоптоз [24]. Высокий уровень белка NS5A также ассоциирован с появлением активных форм кислорода (АФК) в гепатоцитах, что может вызывать окислительный стресс и способствовать развитию гепатоцеллюлярной карциномы. Наряду с неструктурными компонентами белки капсида вируса E1 и E2 также являются причиной сильного окислительного стресса, что ускоряет развитие опухоли. Интересно отметить, что экспрессия белка NS3-NS5B достаточна для появления двухмембранных везикул, которые напоминают аутофагосомы, а белок NS4B индуцирует липидизацию LC3 и накопление аутофагосом [24]. Таким образом, вирус гепатита C, подавляя апоптотическую гибель, может использовать аутофагический путь для усиления своей репликации и подавления противовирусного интерферон-зависимого пути.

Такие ДНК-вирусы, как аденовирусы и SV40, используют механизм репликации ДНК клетки-хозяина для распространения вирусной инфекции. Для этого вирусный T-антиген или белки аденовируса E1B связывают p53 и инактивируют его, позволяя клетке избегать остановки клеточного цикла и способствуя переходу в S-фазу [25]. Более того, T-антиген вируса обладает свойством «ДНК-мимикрии» [25], имитируя заряд и контур дуплекса ДНК. Данная особенность позволяет T-антигену связываться с p53 и тем самым нарушать транскрипционную регуляцию генов-мишеней p53, что приводит к трансформации клетки-хозяина [26]. Связь между p53 и SV40 может не только подавлять нормальные функции p53, но и стимулировать «вспомогательную» активность для развития SV40. *N*-концевой домен p53 выступает в качестве основы для привлечения транскрипционных регуляторов, таких как p300/CBP и MDM2, тем самым изменяя экспрессию клеточных генов, необходимых для распространения вируса [27].

Вирус папилломы человека (ВПЧ), один из наиболее известных онкогенных вирусов, ассоциированный с доброкачественной гиперплазией ткани, а также с аногенитальными карциномами, способен использовать особые свойства своих вирусных белков E6 и E7 для ингибирования активности онкосупрессора p53. Вирусный белок E6 путем взаимодействия с E3 убиквитин-лигазой E6AP способен вызывать 26S-протеасомную деградацию p53, что приводит к снижению уровня p53 в инфицированных клетках. Недавно было показано, что вирусный белок E7 влияет на функционирование транскрипционного репрессорного комплекса DREAM. Путь p53-p21-DREAM является одним из ключевых в активации контрольных точек клеточного цикла с помощью p53. Запуская этот путь, p53 подавляет ряд генов, контролируемых комплексом DREAM. Однако онкобелок E7 способен напрямую связываться с комплексом DREAM и усиливать экспрессию большинства генов клеточного цикла, подавляя при этом функции p53 [28]. Таким образом, белки E6 и E7 ВПЧ, влияя на уровень p53 и его сигнальный путь, вызывают изменения в клеточном цикле хозяина, что приводит к нерегулируемому делению клеток и подавлению апоптоза (рисунок).

Неонкогенные вирусы, такие как вирус оспы, имеющие большую ДНК [29], для обеспечения ее синтеза уменьшают уровень и стабильность p53. Было обнаружено, что киназа B1R, кодируемая ранним вирусным геном, гиперфос-



Подавление внешнего и внутреннего пути апоптоза вирусной инфекцией и модуляция клеточного сигналинга (обьяснения см. в тексте). Красные стрелки обозначают подавление вирусами соответствующей мишени, синие стрелки – активацию выбранного пути или белка. Красным курсивом отмечены гены, связанные с ингибированием апоптотической гибели, синим курсивом – гены, участвующие в его запуске. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

форилирует p53 по остаткам Ser-15 и Thr-18, что приводит к увеличению его убиквитинилирования и деградации [30].

Вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), который вызывает снижение числа CD4-лимфоцитов и нарушение функций иммунной системы, также взаимодействует с белком p53 в процессе инфицирования и в зависимости от стадии инфекции либо подавляет, либо активируют его. На ранней стадии заражения белки ВИЧ-1, такие как Nef и LTR, взаимодействуют непосредственно с p53 через его *N*-концевую часть и инактивируют этот белок, снижая его транскрипционную активность и как след-

ствие апоптоз [31]. На более поздних стадиях Tat-белки ВИЧ-1 способны индуцировать активность p53, стимулируя апоптоз Т-клеток и вызывая распространение ВИЧ-1 [32].

Недавние исследования вируса Эпштейн–Барра (ВЭБ) из семейства герпесвирусов выявили вирусный онкоген EBNA1, который влияет на путь p53 через свою мРНК. Кодируемый вирусом белок EBNA1 подавляет трансляцию собственной мРНК, что приводит к активации PI3Kδ-киназы и стабилизации p53-специфической убиквитинлигазы (MDM2), которая вызывает моноубиквитинирование p53 и его деградацию под действием ядерных и цитоплазматических протеасом [33]. Таким образом, различные типы онкогенных вирусов, используя собственные белки или РНК, способны влиять на эндогенный уровень p53 или ингибировать его транскрипционную активность, подавляя развитие апоптотического пути и стимулируя пролиферацию клеток хозяина.

ИНГИБИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОР-ЗАВИСИМОГО ПУТИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ

Многие вирусы выработали различные стратегии для вмешательства не только во внутренний клеточный путь, но и в сигнализацию всего внешнего пути апоптоза. Опосредованный рецепторами смерти апоптоз играет важную роль в патогенезе вирусной инфекции и противовирусной реакции хозяина. Многие вирусы приобрели способность подавлять рецептор-зависимый апоптоз и уклоняться от иммунного ответа хозяина с помощью вирус-кодируемых антиапоптотических факторов (рисунок) [34].

Некоторые вирусы, такие как поксвирусы, способны кодировать гомологичные рецепторам смерти белки (T2-белок, CrmE), которые в свободном виде способны нейтрализовать лиганд TNF, необходимый для запуска внешнего пути апоптоза [35]. Вирусный белок гепатита B (HBc) выступает мощным ингибитором TRAIL-индуцированного апоптоза в клетках гепатомы человека. Устойчивость HBc-экспрессирующих клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу связана со значительным снижением экспрессии рецептора смерти 5 (DR5 или TRAILR2) и наблюдалась у пациентов с хроническим гепатитом [36]. ВЭБ, напротив, предотвращает активацию TNF-пути путем снижения экспрессии рецептора TNFR1 [37]. Следует отметить, что аденовирусы и вирус папилломы человека также способны подавлять экспрессию рецепторов смерти Fas и TNFR1/2 [38, 39].

Помимо регуляции уровня рецепторов смерти на поверхности клетки и концентрации лигандов, вирусы способны влиять на сборку главных апоптотических комплексов внешнего пути апоптоза – DISC и комплекс I. Было показано, что многие вирусы из семейства герпесвирусов, а также поксвирусов кодируют белок vFLIP, гомологичный белку-регулятору клеточной гибели – cFLIP. Белок vFLIP содержит в своей структуре два эффекторных домена смерти (DED), благодаря которым он взаимодействует с белком-адаптером комплекса DISC – FADD, предотвращая активацию инициаторной каспазы-8 и запуск апоптотического пути [40]. Вирус гепатита C, в свою очередь, способен регулировать уровень экспрессии эндогенного белка cFLIP и подавлять активацию каспазы-8, тем самым смещая равновесие в сторону некроптотической гибели клеток [41, 42].

Особо следует отметить роль ВПЧ в подавлении TNF-опосредованного апоптоза. ВПЧ кодирует два онкобелка, E6 и E7, которые непосредственно ответственны за развитие ВПЧ-индуцированного канцерогенеза. В ходе исследований было показано, что онкобелок E6 взаимодействует с доменом смерти TNFR1 и блокирует взаимодействие TNFR1 с белком-адаптером TRADD, подавляя запуск апоптоза [43]. Белок E6 также может защищать клетки от TRAIL-индуцированного апоптоза, способствуя деградации белка FADD и каспазы-8 [44]. Онкобелок E7 ВПЧ, в свою очередь, ингибирует TNF-опосредованный апоптоз путем модуляции уровня E3-убиквитин лигазы cIAP2, которая участвует в деградации каспаз и белков комплекса DISC [45].

Были также отмечены случаи, когда вирусные белки взаимодействовали напрямую с каспазами и подавляли их активность. Представители семейства герпесвирусов, вирус простого герпеса и цитомегаловирусы, кодируют белки-ингибиторы – рибонуклеотидредуктазу R1 и vICA соответственно. Эти белки способны подавлять Fas-опосредованный апоптоз путем связывания с продоменом прокаспазы-8 через эффекторный домен смерти и предотвращать ее активацию [46, 47]. Поксвирусы (вирус коровьей и кроличьей оспы, натуральной оспы и др.) также кодируют консервативные ингибиторы сериновых протеаз – серпины, которые подавляют активность каспазы-8 и -10 при запуске внешнего пути апоптоза [48].

Таким образом, многие вышеперечисленные онкогенные вирусы приобрели способность подавлять внешний путь апоптоза и избегать иммунный ответ хозяина главным образом за счет направленного подавления рецепторов смерти

клеток хозяина и их лигандов, а также влияя на ключевые компоненты рецепторного комплекса.

ИНГИБИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА

В процессе эволюции вирусов был выявлен еще один способ негативной регуляции апоптоза, а именно модуляция уровня белков семейства Bcl-2. В настоящее время описано более 30 белков млекопитающих этого семейства или ассоциированных с ним, которые условно разделены на анти- и проапоптотические [49]. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 включают Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 и Bfl-1/A1 и имеют общую структурную гомологию. Эти антиапоптотические белки могут напрямую взаимодействовать с проапоптотическими белками Bim, Puma, Bad, Bid, Bik, Bmf, Hrk, Bax, Bak и Noxa и подавлять их активность. Активация апоптоза способна смещать баланс в сторону проапоптотических белков Bcl-2 семейства, что приводит к сборке Bax-Bak мультимерных пор на поверхности митохондриальной мембраны, ее пермеабилизации и, как сказано выше, выходу цитохрома *c* и других факторов в цитозоль [50].

Существует много крупных ДНК-вирусов, которые имитируют белок Bcl-2 (vBcl-2), предотвращая накопление и олигомеризацию проапоптотических белков Bax и Bak и запуск внутреннего апоптотического пути. Остановка преждевременной гибели клеток хозяина на начальных стадиях вирусной инфекции имеет решающее значение для успешного инфицирования [51] (рисунок).

Одним из первых вирусов, в котором был обнаружен гомолог Bcl-2-белка, был аденовирус. Белок E1B 19K имеет гомологичную последовательность BH1 и BH2 доменам Bcl-2-белка. Было показано, что E1B 19K способен взаимодействовать с Bax-, Bak- и Bik-белками клетки-хозяина и функционально взаимозаменять антиапоптотический белок Bcl-2 при аденовирусной инфекции, выступая мощным ингибитором апоптоза [52, 53].

Многие представители семейства вируса герпеса, такие как ВЭБ и герпесвирус, ассоциируемый с саркомой Капоши, также кодируют гомологи Bcl-2-белка: BHRF1 и Ks-Bcl-2 соответственно [54, 55]. Исследования показали, что BHRF1 и Ks-Bcl-2-белки с большей аффинностью способны связываться с такими проапоптотическими белками, как Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa, Bax, подавляя их и вызывая остановку апоптоза [56, 57]. Белок цитомегаловирусной инфекции vMIA, напротив, не имея гомологии с Bcl-2, по своей третичной структуре похож на Bcl-xL. vMIA способен связываться с проапоптотическими белками Bax и Bak, предотвращать их олигомеризацию и открытие митохондриальных пор [58, 59].

Следует также отметить, что герпесвирус, ассоциируемый с саркомой Капоши, кодирует дополнительный антиапоптотический белок, который является гомологом клеточного белка survivin, члена семейства белков-ингибиторов апоптоза (IAP), блокирующих активность каспаз и подавляющих гибель клеток. Этот белок называют K7 или вирусный ингибитор апоптоза (vIAP) [60]. Было показано, что vIAP связывается с клеточным Bcl-2-белком, а также с активированной каспазой-3, ингибируя ее протеолитическую активность и подавляя проапоптотическую сигнализацию в клетке [60].

Семейство поксвирусов, являясь крупным ДНК-вирусом, также содержит в своей структуре ингибиторы апоптоза. Так, белок F1L вируса коровьей оспы, не имея сходств в своей последовательности с белком Bcl-2, способен мимикрировать необычную топологическую укладку третичной структуры Bcl-2, что позволяет ему связываться с такими проапоптотическими белками, как Bim [61] и Bak [62], предотвращая развитие внутреннего пути апоптоза. Следует добавить, что многие представители семейства поксвирусов кодируют ингибиторы проапоптотических BH3-содержащих белков, демонстрируют высокую адаптивность к структуре Bcl-2 и способность модулировать сигналинг митохондрия-зависимого апоптоза.

Ряд штаммов семейства поксвирусов содержит в структуре своего генома еще один антиапоптотический белок – vGAAP (viral Golgi anti-apoptotic protein). vGAAP не является необходимым компонентом для репликации вируса, однако влияет на его вирулентность. Интересно, что vGAAP демонстрирует очень высокую консервативность с белком человека (hGAAP), который локализуется в комплексе Гольджи, образуя катионный канал, и регулирует потоки ионов кальция (Ca^{2+}) в клетке [63]. Повышенная экспрессия vGAAP или hGAAP приводила к устойчивости клеток к апоптотической гибели, что, вероятно, обусловлено снижением выхода Ca^{2+} из внутриклеточных запасов и уменьшением проникновения ионов Ca^{2+} в митохондрии [63]. Тем не менее детальный механизм, с помощью которого GAAP контролируют апоптоз, до сих пор неизвестен.

Почти все ингибирующие апоптоз вирусные белки vBcl-2 содержат трансмембранные якорные домены, которые необходимы для их лока-

лизации на внешней митохондриальной мембране. По-видимому, различные белки vBcl-2 ингибируют разные стадии активации Bax и транслокацию на внешнюю митохондриальную мембрану, что позволяет с высокой степенью вариативности регулировать внутренний путь апоптоза [64].

Некоторые вирусы, такие как вирус гепатита B и C, способны влиять на события апоптоза, происходящие после открытия митохондриальных пор. Вирус гепатита C, используя неструктурные белки NS5A/B, подавляет активацию каспазы-3, предположительно, путем ингибирования каспазы-9 [65]. Вирусный белок HBx вируса гепатита B, связываясь с апоптотическим фактором AIF, влияет на появление высокомолекулярных фрагментов ДНК и конденсацию хроматина и предотвращает развитие апоптоза [66]. Было также отмечено, что экспрессия HBx способна влиять на локализацию и активность белков Drp1 и Parkin, смещая равновесие клеточной гибели в сторону митофагии [67].

Тем не менее основной мишенью внутреннего пути апоптоза для многих онкогенных вирусов являются представители семейства Bcl-2. Кодируемые вирусом белки демонстрируют высокую степень адаптивности к структуре Bcl-2-белков и способность модулировать передачу сигналов через различные механизмы.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ PI3K-Akt КАК МИШЕНЬ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа) и Akt (протеинкиназа B) играют важную роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза [68]. Способность Akt предотвращать апоптотическую гибель в клеточных линиях осуществляется путем фосфорилирования и ингибирования проапоптотических медиаторов, таких как Bad, Bax и каспаза-9 [69, 70], а также активацией транскрипционного фактора CREB, или IkB-киназы (IKK), являющейся положительным регулятором NF-κB, для изменения экспрессии генов с антиапоптотической активностью [71]. Поэтому во многих опухолевых тканях сигнальный путь PI3K и Akt гиперактивен [72].

Некоторые онкогенные вирусы, такие как ВПЧ, семейство герпесвирусов (ВЭБ, KSHV), Т-лимфотропный ретровирус человека, также известный как ретровирус Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (HTLV-1), развили механизмы активации этого сигнального пути для ингибирования апоптоза или аутофагии, которая может препятствовать вирусной репликации [73]. Наиболее широко изученным является вирус ВПЧ, в котором каждый из вирусных онкобелков E5, E6 и E7 прямо или косвенно направлен на PI3K-Akt-путь и способствует выживанию клеток и их делению, а также прогрессии злокачественных образований [74].

Мембранный белок герпесвируса ВЭБ LMP2A также индуцирует фосфорилирование Akt и активирует путь PI3K-Akt, что предотвращает удаление зараженных клеток и обеспечивает селективное преимущество для LMP2A-экспрессирующих клеток во время развития ВЭБ-ассоциированных злокачественных новообразований [75]. LMP2A-Опосредованная активация пути PI3K-Akt также ингибирует дифференцировку эпителиальных клеток в ВЭБ-инфицированных клетках, тем самым способствуя прогрессированию ВЭБ-связанных карцином и лимфом [76]. Вирус Капоши из семейства герпесвирусов способен кодировать вирусный рецептор, сопряжённый с G-белком (vGPCR), приводящий к фосфорилированию Akt и индуцирующий саркомогенез на аллографтной модели мышей [77]. Более того повышенная активация Akt наблюдалась и в биоптатах саркомы Капоши человека, взятых у лиц с вирусом иммунодефицита [77]. В B-лимфоцитах экспрессия белка вируса Капоши K1 приводила к активации PI3P-Akt-пути, ингибированию фосфатазы PTEN и членов семейства транскрипционных факторов Forkhead (FKHR), которые являются ключевыми регуляторами клеточного цикла и апоптоза. Экспрессия вирусного белка K1 способствует выживанию клеток и патогенезу вируса, предотвращая преждевременный апоптоз вирус-инфицированных клеток (рисунок).

РНК-содержащий ретровирус HTLV-1, в свою очередь, модулирует Akt в $CD4^+$ Т-клетках, способствуя длительной латентной фазе [79]. Было обнаружено, что онкобелок HTLV-1 (Tax) активирует путь Akt и индуцирует Akt-зависимую инактивацию транскрипционного фактора FOXO3 (Forkhead box O3), который вызывает удаление $CD4^+$ Т-клеток путем индукции проапоптотических и антипролиферативных генов-мишеней [79]. Таким образом, ингибирование FOXO3 способствует выживанию и пролиферации $CD4^+$ Т-клеток, которые сохраняют способность распространять инфекционные частицы HTLV-1 [79].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NF-κB КАК АНТОГОНИСТ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ

Активация PI3K-Akt-пути может приводить к запуску другого нисходящего сигнального пу-

ти NF-κB, который также достаточно часто активируется во многих видах раковых клеток и способствует развитию опухолевого процесса [80]. Существует несколько механизмов, благодаря которым NF-κB антагонизирует гибель клеток. Во-первых, активация NF-κB приводит к повышению уровня антиапоптотических генов, таких как cIAP1/2, Bcl-2, Bcl-xL, TRAF1/2, survivin, p21, а также индуцирует экспрессию некоторых проонкогенных генов и ряда провоспалительных цитокинов [81]. Кроме того, сигнализация NF-κB способствует прогрессированию опухоли, облегчая переход эпителиальных клеток в мезенхимальные и метастазирование, способствуя васкуляризации опухолей [82].

Активация NF-κB также является частью ответа на острую вирусную инфекцию, но некоторые вирусы могут использовать конститутивную активацию NF-κB для своего распространения. Например, трансмембранный белок LMP1 ВЭБ стимулирует развитие лимфомы, активируя запуск NF-κB-пути [83]. LMP1 способен взаимодействовать с адаптерными молекулами TRAF, как клеточные рецепторы TNFR семейства, что обуславливает его участие в передаче внутриклеточных сигналов. Таким образом, LMP1-индуцированная активация NF-κB способствует пролиферации и выживанию инфицированных клеток [84].

NF-κB также конститутивно активируется в большинстве клеток первичной выпотной лимфомы (PEL), индуцированной вирусом Капоши [85]. В этих клетках вирусный белок vFLIP активирует путь NF-κB, связываясь непосредственно с регуляторной субъединицей комплекса IKK – NEMO (также известна как IKK-gamma), что приводит к активации этого комплекса и высвобождению компонентов ДНК-связывающих транскрипционных факторов [86]. У трансгенных мышей, экспрессирующих вирусный белок vFLIP, активация NF-κB-пути приводит к усиленной пролиферации лимфоцитов и увеличению частоты встречаемости лимфомы [87].

Ретровирус HTLV-1 способен похожим образом влиять на активацию NF-κB-пути. Вирусный онкобелок Tax модулирует клеточные сигнальные пути для усиления пролиферации Т-клеток и выживания. Новые исследования показали, что белок Tax, влияя на активацию убиквитин-зависимых киназ, способен подвергаться K63-зависимому полиубиквитинированию. Эта модификация имеет ключевое значение для его взаимодействия с NEMO и активации NF-κB (рисунок) [88].

Следует отметить, что некоторые онкогенные вирусы, такие как вирус гепатита B и C, ВЭБ, способны вызывать увеличение уровня АФК в клетках в связи с дисфункцией митохондрий и реакцией на несвернутые белки. Такой вирус-индуцированный окислительный стресс способен запускать не только метаболические изменения, но и активацию NF-κB, что способствует онкогенезу в тканях печени и крови [89]. Неонкогенные вирусы, такие как вирус гепатита дельта, коинфицирующий клетки хозяина совместно с вирусом гепатита B, усиливают продукцию АФК и активируют путь NF-κB и STAT3, что может привести к ускорению развития патологий печени и появлению гепатоцеллюлярной карциномы [90].

NF-κB-опосредованное воспаление играет важную роль в функционировании правильного врожденного иммунного ответа на острую инфекцию, тем не менее воздействие вирусных белков на ключевые мишени данного пути способно вызвать трансформацию клеток. Активность NF-κB не только способствует пролиферации опухолевых клеток, подавляет апоптоз, но и индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход и метастазирование [91]. Таким образом, подавление NF-κB-пути в инфицированных клетках делает данный путь перспективной терапевтической мишенью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Когда нарушаются нормальные механизмы контроля роста клеток и ее гибели, некоторые клетки могут проявлять неконтролируемую пролиферацию и перестают выполнять свои тканеспецифические функции, что приводит к развитию рака. Считается, что заражение онкогенными вирусами вызывает ~15–20% всех опухолевых заболеваний человека [92]. В настоящее время наиболее известны ВЭБ, вирус гепатита B и C, Т-лимфотропный вирус человека 1 (HTLV-1), папилломавирусы человека, а также герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV), и клеточный полиомавирус Меркеля (MCPyV) (таблица).

Следует также отметить еще один тип вирусов, наиболее исследуемый и актуальный в последнее время – SARS-CoV-2 семейства коронавирусов. Данный вирус принадлежит к семейству неретровирусных РНК-вирусов с одноцепочечным РНК-геномом. Многие исследования продемонстрировали способность вируса запускать как внешний, так и внутренний путь апоптотической гибель клеток хозяина, что облегчает распространение вируса и отягчает клиническую картину [93, 94]. Однако некоторые авторы предполагают, что SARS-CoV-2 может способствовать постоянной инфекции внутри хозяина,

фиброзу легких, что через какое-то время, например, через несколько лет может привести к всплеску новообразований [95]. Один из механизмов, который был предложен авторами на основании гомологии белков с SARS-CoV-1, это разрушение белка-онкосупрессора p53. Другим механизмом, который может привести к канцерогенезу, является цитокиновый шторм и окислительный стресс. Последний может выступить как инициатором, так и промотором канцерогенеза благодаря прямому мутагенному действию АФК на ДНК, а также способствовать пролиферации и инвазии клеток. Однако экспериментальные данные, подтверждающие эти гипотезы, еще не выявлены.

Онкогенные вирусы человека имеют разнообразные геномы, клеточные тропизмы, онкологические патологии, однако у них есть много общих свойств, которые могут привести к онкогенезу.

Так, большинство онкогенных вирусов передаются между людьми и вызывают хронические инфекции, которые длятся годами без явных симптомов. На протяжении этого времени онкогенные вирусы адаптируются к клетке хозяина, меняя клеточные процессы и нарушая иммунное распознавание. Вирусные онкобелки способны манипулировать как внешним путем запуска апоптоза, так и внутренним, влияя на экспрессию рецепторов смерти, сборку апоптотических комплексов, подавляя активность каспаз и проапоптотических белков. Однако подавление иммунной системы и неадекватный иммунный надзор способны индуцировать бесконтрольное размножение вируса и активную экспрессию вирусных белков, которые нарушают регуляцию пролиферации клеток хозяина и стимулируют образование опухолей [96]. Хотя злокачественное перерождение является объединяющим патологическим признаком для онкогенных вирусов, тем не менее он не является эволюционно выгодным для вируса и необходимым для его распространения.

Логичным подходом к профилактике или лечению раковых заболеваний вирусной этиологии является направленное подавление вируса. Этот принцип был подтвержден успехами в клинической практике, которые резко снизили количество вирус-ассоциированных опухолевых заболеваний [97]. Появление противовирусной терапии вируса гепатита С позволило значительно улучшить результативность лечения подавляющего большинства пациентов и остается эффективным способом профилактики гепатоцеллюлярной карциномы [98]. В настоящее время применение вакцины против ВПЧ и вируса гепатита В в развитых и некоторых развивающихся странах позволило существенно снизить заболеваемость раком шейки матки, печени и других вирус-ассоциированных заболеваний. Также сейчас успешно проводятся испытания вакцины и иммунотерапии против ВЭБ [99]. Профилактика или лечение ВЭБ может снизить частоту возникновения лимфопролиферативных заболеваний, а также некоторых лимфом и карциномы носоглотки [100].

Таким образом, разработка противовирусных препаратов, а также иммунологическая терапия, направленная на антигены опухоли, являются приоритетными целями, которые должны быть достигнуты в современной борьбе с онкологическими заболеваниями.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект 19-15-00125). Работа в лабораториях авторов также поддержана грантами РФФИ (18-29-09005, 20-015-00157), Шведским (190345) и Стокгольмским онкологическими фондами.

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

1. Jin, Z., and El-Deiry, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 139-163, doi: 10.4161/cbt.4.2.1508.
2. Schleich, K., Warnken, U., Fricker, N., Öztürk, S., Richter, P., et al. (2012) Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model, *Mol. Cell*, **47**, 306-319, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.006.
3. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation, *Science*, **281**, 1305-1308, doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
4. Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I. N. (2014) Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 505-517, doi: 10.1007/s00018-014-1757-2.
5. Raab-Traub, N. (2012) Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis, *Curr. Opin. Virol.*, **2**, 453-458, doi: 10.1016/j.coviro.2012.07.001.
6. Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004) Epstein–Barr virus: 40 years on, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 757-768, doi: 10.1038/nrc1452.
7. Levrero, M., and Zucman-Rossi, J. (2016) Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.*, **64**, 84-101, doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.021.
8. Gessain, A., and Cassar, O. (2012) Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection, *Front. Microbiol.*, **3**, doi: 10.3389/fmicb.2012.00388.

9. Matsuoka, M., and Jeang, K. T. (2007) Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation, *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 270-280, doi: 10.1038/nrc2111.
10. Schiffman, M., Clifford, G., and Buonaguro, F. M. (2009) Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline, *Infect. Agent. Cancer*, **4**, doi: 10.1186/1750-9378-4-8.
11. Harper, D. M., and DeMars, L. R. (2017) HPV vaccines – a review of the first decade, *Gynecol. Oncol.*, **146**, 196-204, doi: 10.1016/j.ygyno.2017.04.004.
12. Mitchell, J. K., Lemon, S. M., and McGivern, D. R. (2015) How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer? *Curr. Opin. Virol.*, **14**, 101-108, doi: 10.1016/j.coviro.2015.09.003.
13. Goossens, N., and Hoshida, Y. (2015) Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma, *Clin. Mol. Hepatol.*, **21**, 105-114, doi: 10.3350/cmh.2015.21.2.105.
14. Schulz, T. F., and Cesarman, E. (2015) Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus: mechanisms of oncogenesis, *Curr. Opin. Virol.*, **14**, 116-128, doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.016.
15. Wendzicki, J. A., Moore, P. S., and Chang, Y. (2015) Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus, *Curr. Opin. Virol.*, **11**, 38-43, doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.009.
16. Liu, W., MacDonald, M., and You, J. (2016) Merkel cell polyomavirus infection and Merkel cell carcinoma, *Curr. Opin. Virol.*, **20**, 20-27, doi: 10.1016/j.coviro.2016.07.011.
17. Krump, N. A., and You, J. (2018) Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans, *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 684-698, doi: 10.1038/s41579-018-0064-6.
18. Vousden, K. H., and Lane, D. P. (2007) p53 in health and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 275-283, doi: 10.1038/nrm2147.
19. Kaminskyy, V., and Zhivotovsky, B. (2010) To kill or be killed: how viruses interact with the cell death machinery: symposium, *J. Int. Med.*, **267**, 473-482, doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02222.x.
20. Wang, X. W., Gibson, M. K., Yeh, H., Forrester, K., Harris, C. C., et al. (1995) Abrogation of p53-induced apoptosis by the Hepatitis B virus X gene, *Cancer Res.*, **55**, 6012-6016, doi: 10.1385/1-59259-079-9:57.
21. Knoll, S., Fürst, K., Thomas, S., Baselga, S. V., Stoll, A., Schaefer, S., and Pützer, B. M. (2011) Dissection of cell context-dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: A role for HBV-induced HCC, *Cell Cycle*, **10**, 3554-3565, doi: 10.4161/cc.10.20.17856.
22. Chao, C. C. K. (2016) Inhibition of apoptosis by oncogenic hepatitis B virus X protein: Implications for the treatment of hepatocellular carcinoma, *World J. Hepatol.*, **8**, 1061-1066, doi: 10.4254/wjh.v8.i25.1061.
23. Voican, C. S., Mir, O., Loulergue, P., Dhooge, M., Brezault, C., et al. (2016) Hepatitis B virus reactivation in patients with solid tumors receiving systemic anticancer treatment, *Ann. Oncol.*, **27**, 2172-2184, doi: 10.1093/annonc/mdw414.
24. Vescovo, T., Refolo, G., Vitagliano, G., Fimia, G. M., and Piacentini, M. (2016) Molecular mechanisms of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma, *Clin. Microbiol. Infect.*, **22**, 853-861, doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.019.
25. Levine, A. J., and Oren, M. (2009) The first 30 years of p53: Growing ever more complex, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 749-758, doi: 10.1038/nrc2723.
26. Liu, X., and Marmorstein, R. (2006) When viral oncoprotein meets tumor suppressor: a structural view, *Genes Dev.*, **20**, 2332-2337, doi: 10.1101/gad.1471706.
27. Hermannstadter, A., Ziegler, C., Kuhl, M., Deppert, W., and Tolstonog, G. V. (2009) Wild-type p53 enhances efficiency of Simian virus 40 large-T-antigen-induced cellular transformation, *J. Virol.*, **83**, 10106-10118, doi: 10.1128/jvi.00174-09.
28. Engeland, K. (2018) Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM, *Cell Death Differ.*, **25**, 114-132, doi: 10.1038/cdd.2017.172.
29. Moss, B. (1990) Regulation of vaccinia virus transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 661-688, doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.003305.
30. Santos, C. R., Vega, F. M., Blanco, S., Barcia, R., and Lazo, P. A. (2004) The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism, *Virology*, **328**, 254-265, doi: 10.1016/j.virol.2004.08.013.
31. Greenway, A. L., McPhee, D. A., Allen, K., Johnstone, R., et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis, *J. Virol.*, **76**, 2692-2702, doi: 10.1128/jvi.76.6.2692-2702.2002.
32. Thakur, B. K., Chandra, A., Dittrich, T., Welte, K., and Chandra, P. (2012) Inhibition of SIRT1 by HIV-1 viral protein Tat results in activation of p53 pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 245-250, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.084.
33. Gnanasundram, S., Malbert-Colas, L., Chen, S., Fusée, L., Daskalogianni, C., et al. (2020) MDM2's dual mRNA binding domains co-ordinate its oncogenic and tumour suppressor activities, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6775-6787, doi: 10.1093/nar/gkaa431.
34. Benedict, C. A., Norris, P. S., and Ware, C. F. (2002) To kill or be killed: viral evasion of apoptosis, *Nat. Immunol.*, **3**, 1013-1018, doi: 10.1038/ni1102-1013.
35. Reading, P. C., Khanna, A., and Smith, G. L. (2002) Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence, *Virology*, **292**, 285-298, doi: 10.1006/viro.2001.1236.
36. Du, J., Liang, X., Liu, Y., Qu, Z., Gao, L., et al. (2009) Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression, *Cell Death Differ.*, **16**, 219-229, doi: 10.1038/cdd.2008.144.
37. Morrison, T. E., Mauser, A., Klingelhutz, A., and Kenney, S. C. (2004) Epstein–Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1, *J. Virol.*, **78**, 544-549, doi: 10.1128/jvi.78.1.544-549.2004.
38. Benedict, C. A., Norris, P. S., Prigozy, T. I., Bodmer, J. L., Mahr, J. A., et al. (2001) Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2, *J. Biol. Chem.*, **276**, 3270-3278, doi: 10.1074/jbc.m008218200.
39. Kabsch, K., and Alonso, A. (2002) The Human Papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms, *J. Virol.*, **76**, 12162-12172, doi: 10.1128/jvi.76.23.12162-12172.2002.
40. Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., et al. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors, *Nature*, **386**, 517-521, doi: 10.1038/386517a0.
41. Kim, H., and Ray, R. (2014) Evasion of TNF-α-mediated apoptosis by hepatitis C virus, *Methods Mol. Biol.*, **1155**, 125-132, doi: 10.1007/978-1-4939-0669-7_11.
42. Nailwal, H., and Chan, F. K. M. (2019) Necroptosis in anti-viral inflammation, *Cell Death Differ.*, **26**, 4-13, doi: 10.1038/s41418-018-0172-x.
43. Filippova, M., Filippov, V. A., Kagoda, M., Garnett, T., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, P. J. (2009) Complexes of Human Papillomavirus type 16 E6 proteins form pseu-

do-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis, *J. Virol.*, **83**, 210-227, doi: 10.1128/jvi.01365-08.
44. Garnett, T. O., Filippova, M., and Duerksen-Hughes, P. J. (2006) Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis, *Cell Death Differ.*, **13**, 1915-1926, doi: 10.1038/sj.cdd.4401886.
45. Yuan, H., Fu, F., Zhuo, J., Wang, W., Nishitani, J., An, D. S., Chen, I. S. Y., and Liu, X. (2005) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis, *Oncogene*, **24**, 5069-5078, doi: 10.1038/sj.onc.1208691.
46. Dufour, F., Sasseville, A. M. J., Chabaud, S., Massie, B., Siegel, R. M., and Langelier, Y. (2011) The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNFα- and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8, *Apoptosis*, **16**, 256-271, doi: 10.1007/s10495-010-0560-2.
47. McCormick, A. L., Skaletskaya, A., Barry, P. A., Mocarski, E. S., and Goldmacher, V. S. (2003) Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses, *Virology*, **316**, 221-233, doi: 10.1016/j.virol.2003.07.003.
48. Veyer, D. L., Carrara, G., Maluquer de Motes, C., and Smith, G. L. (2017) Vaccinia virus evasion of regulated cell death, *Immunol. Lett.*, **186**, 68-80, doi: 10.1016/j.imlet.2017.03.015.
49. Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., and Green, D. R. (2010) The BCL-2 family reunion, *Mol. Cell*, **37**, 299-310, doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.025.
50. Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points, *Cell*, **116**, 205-219, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00046-7.
51. Altmann, M., and Hammerschmidt, W. (2005) Epstein–Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis, *PLoS Biol.*, **3**, 1-10, doi: 10.1371/journal.pbio.0030404.
52. Han, J., Wallen, H. D., Nuñez, G., and White, E. (1998) E1B 19,000-molecular-weight protein interacts with and inhibits CED-4-dependent, FLICE-mediated apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6052-6062, doi: 10.1128/mcb.18.10.6052.
53. Farrow, S. N., White, J. H. M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C., and Brown, R. (1995) Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K, *Nature*, **374**, 731-733, doi: 10.1038/374731a0.
54. Sarid, R., Sato, T., Bohenzky, R. A., Russo, J. J., and Chang, Y. (1997) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional Bcl-2 homologue, *Nat. Med.*, **3**, 293-298, doi: 10.1038/nm0397-293.
55. Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., and Rickinson, A. (1993) Epstein–Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8479-8483, doi: 10.1073/pnas.90.18.8479.
56. Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., et al. (2008) Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands, *Cell Death Differ.*, **15**, 1564-1571, doi: 10.1038/cdd.2008.83.
57. Flanagan, A. M., and Letai, A. (2008) BH3 domains define selective inhibitory interactions with BHRF-1 and KSHV BCL-2, *Cell Death Differ.*, **15**, 580-588, doi: 10.1038/sj.cdd.4402292.
58. Karbowski, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis, *Nature*, **443**, 658-662, doi: 10.1038/nature05111.
59. Norris, K. L., and Youle, R. J. (2008) Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins, *J. Virol.*, **82**, 6232-6243, doi: 10.1128/jvi.02710-07.
60. Wang, H. W., Sharp, T. V., Koumi, A., Koentges, G., and Boshoff, C. (2002) Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin, *EMBO J.*, **21**, 2602-2615, doi: 10.1093/emboj/21.11.2602.
61. Taylor, J. M., Quilty, D., Banadyga, L., and Barry, M. (2006) The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax, *J. Biol. Chem.*, **281**, 39728-39739, doi: 10.1074/jbc.M607465200.
62. Postigo, A., Cross, J. R., Downward, J., and Way, M. (2006) Interaction of F1L with the BH3 domain of Bak is responsible for inhibiting vaccinia-induced apoptosis, *Cell Death Differ.*, **13**, 1651-1662, doi: 10.1038/sj.cdd.4401853.
63. Carrara, G., Parsons, M., Saraiva, N., and Smith, G. L. (2017) Golgi anti-apoptotic protein: a tale of camels, calcium, channels and cancer, *Open Biol.*, **7**, 170045, doi: 10.1098/rsob.170045.
64. Cross, J. R., Postigo, A., Blight, K., and Downward, J. (2008) Viral pro-survival proteins block separate stages in Bax activation but changes in mitochondrial ultrastructure still occur, *Cell Death Differ.*, **15**, 997-1008, doi: 10.1038/cdd.2008.14.
65. Masalova, O., Lesnova, E., Solyev, P., Zakirova, N., Prassolov, V., et al. (2017) Modulation of cell death pathways by Hepatitis C virus proteins in Huh7.5 hepatoma cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2346, doi: 10.3390/ijms18112346.
66. Liu, H., Yuan, Y., Guo, H., Mitchelson, K., Zhang, K., et al. (2012) Hepatitis B virus encoded X protein suppresses apoptosis by inhibition of the caspase-independent pathway, *J. Proteome Res.*, **11**, 4803-4813, doi: 10.1021/pr2012297.
67. Kim, S. J., Khan, M., Quan, J., Till, A., Subramani, S., and Siddiqui, A. (2013) Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis, *PLoS Pathog.*, **9**, 1-12, doi: 10.1371/journal.ppat.1003722.
68. Brazil, D. P., Yang, Z. Z., and Hemmings, B. A. (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 233-242, doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.006.
69. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three akts, *Genes Dev.*, **13**, 2905-2927, doi: 10.1101/gad.13.22.2905.
70. Takino, J. I., Sato, T., Nagamine, K., and Hori, T. (2019) The inhibition of Bax activation-induced apoptosis by RasGRP2 via R-Ras-PI3K-Akt signaling pathway in the endothelial cells, *Sci. Rep.*, **9**, 16717, doi: 10.1038/s41598-019-53419-4.
71. Fresno Vara, J. Á., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004) P13K/Akt signalling pathway and cancer, *Cancer Treat. Rev.*, **30**, 193-204, doi: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007.
72. Zhao, H. F., Wang, J., Shao, W., Wu, C. P., Chen, Z. P., To, S. T., and Li, W. P. (2017) Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development, *Mol. Cancer*, **16**, 100, doi: 10.1186/s12943-017-0670-3.

73. Surviladze, Z., Sterk, R. T., DeHaro, S. A., and Ozbun, M. A. (2013) Cellular entry of Human Papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy, *J. Virol.*, **87**, 2508-2517, doi: 10.1128/jvi.02319-12.
74. Zhang, L., Wu, J., Ling, M. T., Zhao, L., and Zhao, K. N. (2015) The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses, *Mol. Cancer*, **14**, doi: 10.1186/s12943-015-0361-x.
75. Fukuda, M., and Longnecker, R. (2004) Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor-1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *J. Virol.*, **78**, 1697-1705, doi: 10.1128/jvi.78.4.1697-1705.2004.
76. Scholle, F., Bendt, K. M., and Raab-Traub, N. (2000) Epstein–Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt, *J. Virol.*, **74**, 10681-10689, doi: 10.1128/jvi.74.22.10681-10689.2000.
77. Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Gómez-Román, J. J., Li, Y., Sausville, E. A., Sawait, E. T., and Gutkind, J. S. (2004) Akt plays a central role in sarcomagenesis induced by Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4821-4826, doi: 10.1073/pnas.0400835101.
78. Tomlinson, C. C., and Damania, B. (2004) The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus activates the Akt signaling pathway, *J. Virol.*, **78**, 1918-1927, doi: 10.1128/jvi.78.4.1918-1927.2004.
79. Olagnier, D., Sze, A., Bel Hadj, S., Chiang, C., Steel, C., Han, X., Routy, J. P., Lin, R., Hiscott, J., and van Grevenynghe, J. (2014) HTLV-1 Tax-mediated inhibition of FOXO3a activity is critical for the persistence of terminally differentiated $CD4^+$ T cells, *PLoS Pathog.*, **10**, e1004575, doi: 10.1371/journal.ppat.1004575.
80. Bai, D., Ueno, L., and Vogt, P. K. (2009) Akt-mediated regulation of NF-κB and the essentialness of NF-κB for the oncogenicity of PI3K and Akt, *Int. J. Cancer*, **125**, 2863-2870, doi: 10.1002/ijc.24748.
81. Feng, C., Wu, B., Fan, H., Li, C., and Meng, S. (2014) NF-kappaB-induced gp96 up-regulation promotes hepatocyte growth, cell cycle progression and transition, *Acta Microbiol. Sinica*, **54**, 1212-1220.
82. Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., et al. (2004) NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression, *J. Clin. Invest.*, **114**, 569-581, doi: 10.1172/jci21358.
83. Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998) Expression of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11963-11968, doi: 10.1073/pnas.95.20.11963.
84. Wang, L. W., Jiang, S., and Gewurz, B. E. (2017) Epstein–Barr virus LMP1-mediated oncogenicity, *J. Virol.*, **91**, e01718-16, doi: 10.1128/jvi.01718-16.
85. Gopalakrishnan, R., Matta, H., and Chaudhary, P. M. (2013) A purine scaffold HSP90 inhibitor BIIB021 has selective activity against KSHV-associated primary effusion lymphoma and blocks vFLIP k13-induced NF-κB, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 5016-5026, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-12-3510.
86. Briggs, L. C., Chan, A. W. E., Davis, C. A., Whitelock, N., Hotiana, H. A., et al. (2017) IKKγ-mimetic peptides block the resistance to apoptosis associated with Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus infection, *J. Virol.*, **91**, e01170-17, doi: 10.1128/jvi.01170-17.
87. Chugh, P., Matta, H., Schamus, S., Zachariah, S., Kumar, A., Richardson, J. A., Smith, A. L., and Chaudhary, P. M. (2005) Constitutive NF-κB activation, normal Fas-induced apoptosis, and increased incidence of lymphoma in human herpes virus 8 K13 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12885-12890, doi: 10.1073/pnas.0408577102.
88. Lavorgna, A., and Harhaj, E. W. (2014) Regulation of HTLV-1 tax stability, cellular trafficking and NF-κB activation by the ubiquitin-proteasome pathway, *Viruses*, **6**, 3925-3943, doi: 10.3390/v6103925.
89. Kgatle, M. M., Spearman, C. W., Kalla, A. A., and Hairwadzi, H. N. (2017) DNA oncogenic virus-induced oxidative stress, genomic damage, and aberrant epigenetic alterations, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1-16, doi: 10.1155/2017/3179421.
90. Williams, V., Brichler, S., Khan, E., Chami, M., Dény, P., Kremsdorf, D., and Gordien, E. (2012) Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF-κB via oxidative stress, *J. Viral Hepat.*, **19**, 744-753, doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01597.x.
91. Xia, Y., Shen, S., and Verma, I. M. (2014) NF-κB, an active player in human cancers, *Cancer Immunol. Res.*, **2**, 823-830, doi: 10.1158/2326-6066.cir-14-0112.
92. Zur Hausen, H., and de Villiers, E. M. (2014) Cancer "causation" by infections – Individual contributions and synergistic networks, *Semin. Oncol.*, **41**, 860-875, doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.10.003.
93. Ren, Y., Shu, T., Wu, D., Mu, J., Wang, C., et al. (2020) The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells, *Cell. Mol. Immunol.*, **17**, 881-883, doi: 10.1038/s41423-020-0485-9.
94. Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., et al. (2020) Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19, *Lancet*, **395**, 1417-1418, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
95. Alpalhão, M., Ferreira, J. A., and Filipe, P. (2020) Persistent SARS-CoV-2 infection and the risk for cancer, *Med. Hypotheses*, **143**, 109882, doi: 10.1016/j.mehy.2020.109882.
96. Mesri, E. A., Feitelson, M. A., and Munger, K. (2014) Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis, *Cell Host Microbe*, **15**, 266-282, doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011.
97. Van Kriekinge, G., Castellsagué, X., Cibula, D., and Demarteau, N. (2014) Estimation of the potential overall impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer cases and deaths, *Vaccine*, **32**, 733-739, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.049.
98. McQuaid, T., Savini, C., and Seyedkazemi, S. (2015) Sofosbuvir, a significant paradigm change in HCV treatment, *J. Clin. Transl. Hepatol.*, **3**, 27-35, doi: 10.14218/jcth.2014.00041.
99. Schiller, J. T., and Lowy, D. R. (2010) Vaccines to prevent infections by oncoviruses, *Annu. Rev. Microbiol.*, **64**, 23-41, doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134019.
100. Bu, W., Joyce, M. G., Nguyen, H., Banh, D. V., Aguilar, F., et al. (2019) Immunization with components of the viral fusion apparatus elicits antibodies that neutralize Epstein–Barr Virus in B cells and epithelial cells, *Immunity*, **50**, 1305-1316, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.010.

VIRAL INFECTIONS: NEGATIVE REGULATOR OF APOPTOSIS AND FACTOR OF ONCOGENICITY

Review

A. V. Zamaraev[1], B. Zhivotovsky[1,2], and G. S. Kopeina[1]*

[1] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, 119191 Moscow, Russia; E-mail: lirroster@gmail.com*

[2] *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, SE-171 77 Stockholm, Sweden*

Received June 30, 2020
Revised September 9, 2020
Accepted September 9, 2020

The disruption of apoptotic cell death process is closely associated with the etiology of various diseases, including cancer. Permanent viral infections can cause different types of cancers. Oncogenic viruses manipulate both external and internal apoptosis pathways, and inhibit the activity of proapoptotic proteins and signaling pathways, which facilitates carcinogenesis. Ineffective immune surveillance or immune response suppression can induce uncontrolled virus propagation and host cell proliferation. In this review, we discuss current data that provide insights into mechanisms of apoptotic death suppression by viruses and their role in oncogenesis.

Keywords: oncogenic viruses, apoptosis, carcinogenesis

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1411 – 1420

УДК 576.315.42

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ФУНКЦИИ p73, ПРЕДСТАВИТЕЛЯ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ p53

Мини-обзор

© 2020 Дж. Мелино

Department of Experimental Medicine, TOR, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy; E-mail: melino@uniroma2.it

Поступила в редакцию 14.08.2020
После доработки 14.08.2020
Принята к публикации 19.08.2020

Спустя 20 лет после обнаружения белка p53 и определения его ключевой роли в прогрессии рака были идентифицированы еще два члена этого семейства, а именно белки p63 и p73. С тех пор был собран большой объем информации о каждом из этих генов/белков и их взаимодействиях в клетке. Биологическая роль p73 была установлена с помощью четырех различных линий нокаутированных мышей: 1) с полностью удаленным геном *TP73*; 2) с экзонами, кодирующими изоформы полноразмерного белка TAp73; 3) с экзонами, кодирующими укороченную изоформу DNp73; и совсем недавно – 4) с экзонами, кодирующими *C*-концевую изоформу альфа. В этой работе, а также в исследованиях экспрессии генов при раке и огромном числе исследований, проведенных на молекулярном уровне, было выяснено основное участие *TP73* в развитии рака, развитии нервной системы, образовании ресничек и в метаболизме нейронов. В настоящей работе мы обсуждаем основные результаты этих исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: p53, семейство белков p53, p73, рак, образование ресничек, метаболизм, нейробиология.

DOI: 10.31857/S0320972520100085

ВВЕДЕНИЕ

С момента его обнаружения в 1979 г. [1, 2] p53 оказался в центре внимания исследователей биологии рака, так как стала понятна его роль в качестве супрессора опухолевого роста [3]. Интерес еще более возрос, когда были идентифицированы два дополнительных члена этого семейства факторов транскрипции, а именно p63 [4–6] и p73 [7–12]. Все вышеперечисленные факторы транскрипции строго контролируют процессы остановки клеточного цикла и гибели клеток [13, 14] и оказывают сильное влияние на прогрессирование рака [15–19]. Как было ранее показано во многих работах, p53 кодируется геном *TP53*, который в наибольшей степени подвергается мутациям при любых формах рака человека [20–28]. Это служит самым веским обоснованием его значительной функции в качестве опухолевого супрессора [29, 30]. Тем не менее появляется все больше свидетельств того, что p53 и даже в большей мере p73 играют важную роль в нейробиологии [31–33]. Действительно, было показано, что p53 в физиологических условиях экспрессируется в развивающемся мозге [34] и в процессе нейродегенерации у животных моделей [35], что никак не связано с его ролью в гибели клеток.

Функция p73 была детально изучена при помощи четырех различных линий нокаутированных мышей, полученных для выявления различных свойств этого белка в процессе развития живого организма. Первоначальный полный нокаут характеризовался наличием серьезных инфекций [36]. Однако этот фенотип не удалось воспроизвести при последующих нокаутах, возможно, вследствие наличия более радикальных делеций, приводящих к возникновению более агрессивных вторичных инфекций и изменению микробиома, что само по себе может быть опасно для жизни [37–40]. Помимо полного нокаута [36], приводящего к полному удалению гена *TP73*, были созданы два специфических нокаута, сравнивающих роль двух различных изоформ – TAp73 [11] и DNp73 [41]. Наконец был сделан специфический нокаут *C*-концевого участка полноразмерной изоформы альфа [42], который приводил к физиологическому присутствию обычного белка, но при этом изоформа альфа заменялась на изоформу бета. Все 4 нокаута представлены в таблице.

Принятые сокращения: PGC-1α – активированный пролифератором пероксисом рецепторный гамма коактиватор 1, NRF – ядерный респираторный фактор 1.

Мыши, нокаутированные по TP73

Линия	Тяжесть	Фенотип	Ссылка
Trp73$^{-/-}$	тяжелая форма	нейроны, инфекции	[36]
TAp73$^{-/-}$	тяжелая форма	нейроны, рак, старение	[11]
DNp73$^{-/-}$	легкая форма	нейроны	[41]
Trp73d13/d13	тяжелая форма	нейроны	[42]

Здесь мы кратко изложим информацию, полученную нокаутами, о различных биологических функциях.

TAp73 ЯВЛЯЕТСЯ ОПУХОЛЕВЫМ СУПРЕССОРОМ

На рис. 1 показано участие p73 в ответе клетки на повреждения ДНК (DDR, DNA Damage Response), т.е. в процессе, который идет параллельно и полностью независимо от активности p53. Действительно, вслед за ответом на повреждения ДНК происходит активация белка p73 в результате фосфорилирования по остатку Tyr99 белком c-Abl, и активированный p73 участвует в регуляции процесса остановки клеточного цикла и апоптоза [43]. Кроме того, удивительное сходство в структуре гена и аминокислотной последовательности между p53 и p73 указывает на то, что белок p73 аналогично p53 может обладать активностью опухолевого супрессора. Однако это предположение нельзя было проверить на полностью нокаутированных мышах [36], поскольку у этих мышей продолжительность жизни была чрезвычайно короткой. В то же время при специфическом нокауте TAp73 оказалось возможным продемонстрировать роль TAp73 в качестве опухолевого супрессора [11]. С тех пор во многих работах была установлена роль p73 и нарушение его регуляции при прогрессировании рака.

РОЛЬ БЕЛКА p73 В НЕЙРОНАХ

Первым признаком связи p73 с нейробиологией было обнаружение локализации его гена на участке хромосомы 1p36, который обычно отсутствует при нейробластоме [44]. Эта форма рака отличается специфическими изменениями в геноме [45, 46], интеграцией особых молекулярных признаков [47–50] и его прогностическими факторами [51–54], также включающими белки ZNF [46–55]. p73 регулирует развитие центральной нервной системы путем регуляции процесса самообновления нервных стволовых клеток (NSC – neural stem cells) и дифференцировки нейронов. В связи с тем, что в физиологических условиях p73 экспрессируется в виде различных изоформ с использованием различных промоторов, группой Melino были созданы специфические нокауты мышей с удалением изоформы полноразмерного TAp73 и изоформы DNp73, в которой отсутствует *N*-концевой участок [41, 56–58]. В обоих случаях, но более выражено это в первом случае, было обнаружено нарушение развития гиппокампа с разрушением или даже утратой нижней пластинки зубчатой извилины (DG – dentate gyrus), которое наблюдалось вместе с нарушением структуры участков CA1 и CA3 [36]. TAp73 транскрибирует гены метаболизма и нервной системы, включая Sox2, Sox3, TRIM32 и Notch [59]. Кроме того, TAp73 оказывает воздействие на постмитотические нейроны, модулируя экспрессию рецептора нейротрофина p75 (p75NTR – neurotrophin receptor p75), влияющего на рост аксонов и ветвление дендритов [60], а также участвующего в экспрессии синаптических белков, таких как синаптотагмин-1 (synaptotagmin-1) и синтаксин-1A (syntaxin-1A) через микроРНК miR-34a [61, 62]. Эти данные ясно демонстрируют ключевое участие p73 в процессе развития мозга через специфические механизмы транскрипции [63].

Совсем недавно группой Melino [42] была создана четвертая модель нокаутированной мыши с удаленным экзоном 13, который имеет значение для образования типичного структурного мотива, называемого домен SAM (Sterile alpha-motif), присутствующего в физиологических условиях в полноразмерном белке p73 (изоформа альфа). Этот *C*-концевой участок отсутствует в других изоформах, таких как изоформа бета. Следовательно, с помощью этой новой линии мышей оказалось возможным продемонстрировать роль *C*-концевого участка, который действительно отличает эти две изоформы. Мышь Trp73D13$^{-/-}$ заменяет, по сути, изоформу альфа на изоформу бета, действительно являясь минимальной пертурбацией.

Замена изоформы альфа на изоформу бета оказывает значительное влияние на развитие мозга, вызывая нарушение развития гиппокампа, как показано на рис. 2. Интересно, что мыши с этим фенотипом оказались чрезвычайно похожи на ранее описанных мышей, нокаутированных по Trp73. Кроме того, у мышей линии

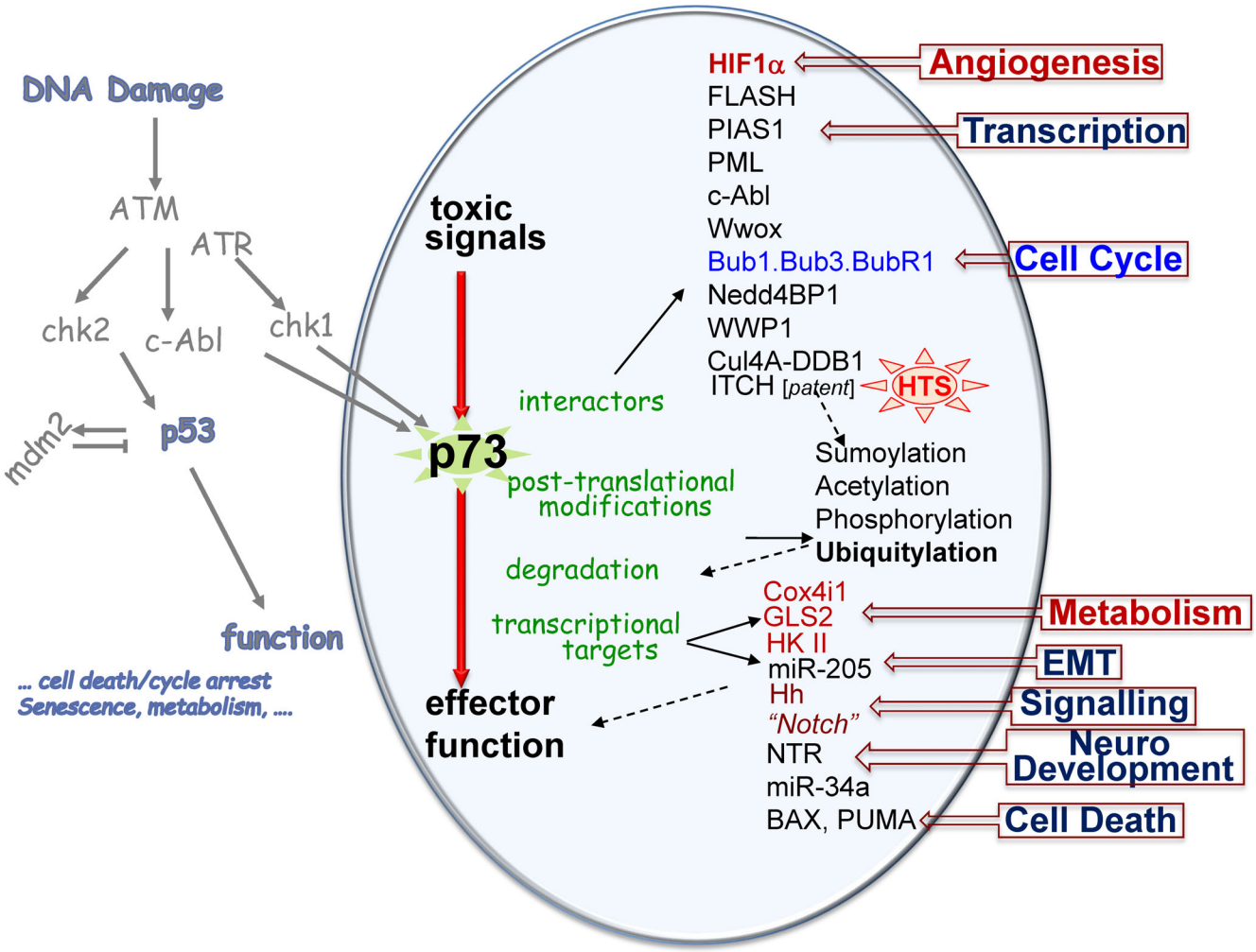


Рис. 1. Взаимодействующие партнеры и транскрипционные мишени белка p73. p73 может быть активирован при повреждении ДНК как часть общего ответа клетки на повреждения ДНК (DNA Damage Response), протекающего параллельно и независимо от белка p53 (левая часть). p73 также может быть индуцирован другими токсическими или физиологическими сигналами, которые до сих пор полностью не изучены. Белок p73 способен физически взаимодействовать с несколькими белковыми комплексами, подвергаясь последующим посттрансляционным модификациям, регулирующим его деградацию и также его транскрипционные мишени (зеленый). Его взаимодействующие партнеры, а также его транскрипционные мишени ответственны за эффекторную функцию p73, как показано на рисунке. HTS – high throughput screen, высокопроизводительный скрининг; EMT – epithelial mesenchymal transition, эпителиально-мезенхимный переход. (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

Trp73d13/d13 в развивающемся мозге наблюдается постепенное снижение количества клеток Кахаля–Ретциуса (CR – Cajal–Retzius) [42, 64] (рис. 2, *b*). Следовательно, нарушение развития гиппокампа, которое наблюдалось при предыдущих нокаутах, является прямым следствием исчезновения клеток Кахаля–Ретциуса, которые в физиологических условиях управляют развитием архитектуры мозга во время эмбрионального развития (подробности см. в исходной работе Amelio et al. [42]). Специфичность действия белка p73 при развитии гиппокампа представляет огромный интерес, учитывая важное значение гиппокампа в нейропатологии [65, 66].

p73 имеет решающее значение для образования ресничек. Неожиданным образом было установлено, что p73 необходим для образования мультицилиарных клеток (MCC – multiciliate cell). Поскольку эти клетки очень важны для физиологии мозга и дыхательных путей и для обеспечения направленного движения жидкостей по поверхности их эпителия, а также для транспорта половых клеток в репродуктивном тракте, роль p73 становится чрезвычайно важной. Этот фенотип может объяснить некоторые из признаков, описанных при первом полном нокауте p73 [36], – гидроцефалию, бесплодие и хронические инфекции дыхательных путей.

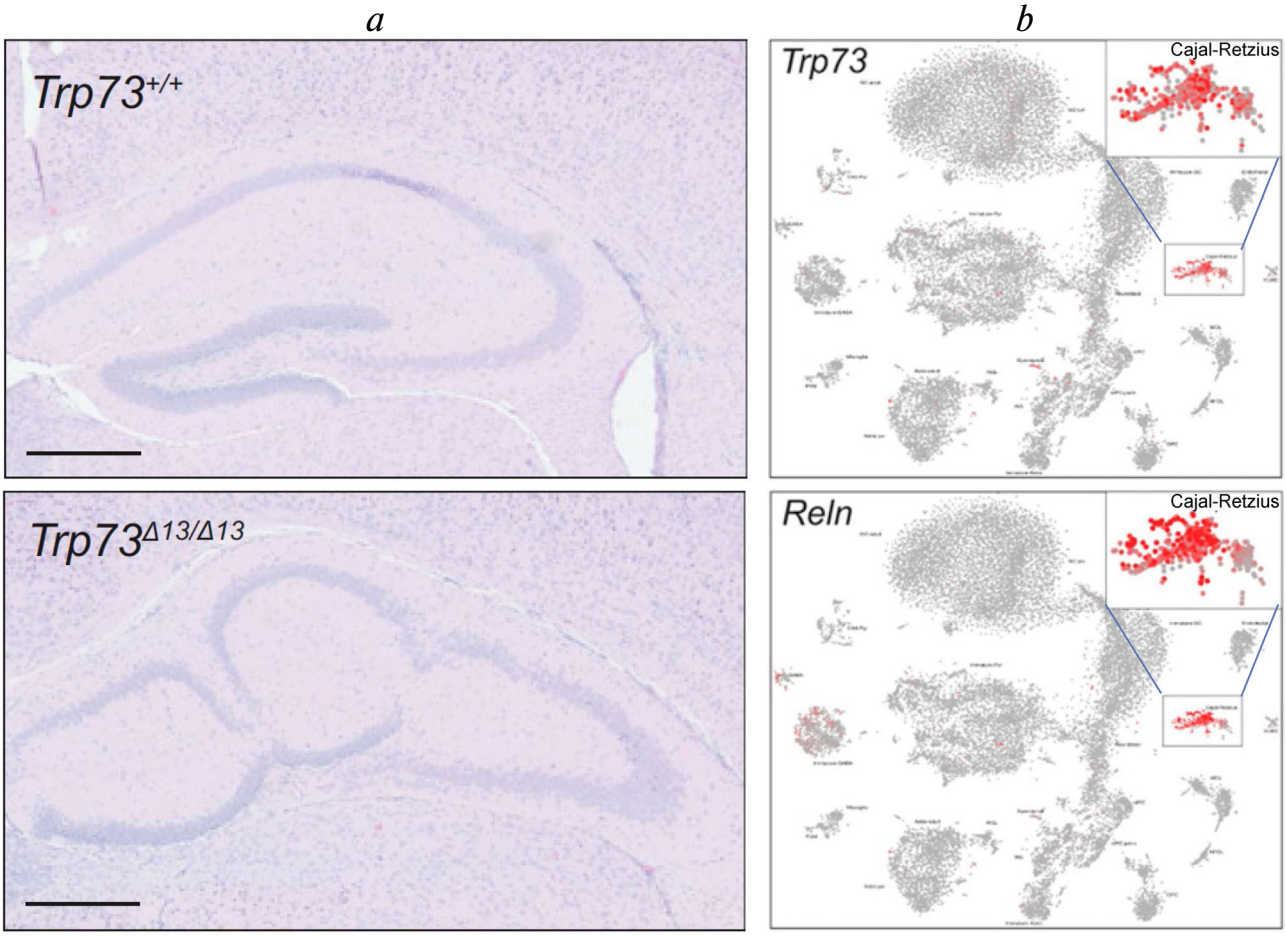


Рис. 2. Нарушение развития гиппокампа у мышей, дефицитных по Trp73. Удаление целого белка p73 (мыши Trp73$^{-/-}$), TAp73 (мыши TA73$^{-/-}$) или его *C*-концевого участка (мыши Trp73d13/d13; показано на рисунке) приводит к возникновению очень сходного фенотипа, характеризующегося недостаточным развитием нижней лопатки зубчатой пластинки. *a* – Искаженный гиппокамп новорожденных мышей Trp73d13/d13, окрашенный гематоксилином и эозином (единица деления шкалы – 500 μm). *b* – Результаты секвенирования РНК единичной клетки из зубчатой пластинки мышей. Красным показана экспрессия или p73, или рилина, которая, по-видимому, строго ограничена клетками Кахаля–Ретциуса. С подробностями можно ознакомиться в статье Amelio et al. [42], а также в статье Hochgerner et al. [64]

Впервые роль TAp73, как главного транскрипционного интегратора процесса образования ресничек, функция которого располагается в цепи событий ранее любого уже известного гена, была установлена в лаборатории Ute Moll [32, 67]. TAp73 контролирует на уровне транскрипции образование ресничек (цилий) (Kif27, Intu, NPHP4, Traf3ip1, Dzip1l и др.) и их подвижность (Dnah3, Dnahc11, Drc1 и др.). Кроме того, описанная позднее метаболическая функция TAp73 также ассоциирована с физиологией ресничек. Интересно, что если изоформа альфа необходима для нейрогенеза гиппокампа [42], то для цилиогенеза она не требуется [68], что подтверждают лежащие в их основе различные молекулярные механизмы.

Метаболическая функция p73. Изучение нокаутированных мышей TAp73 [11] привело к выявлению необычных и неожиданных функций p73. Эти мыши подвергались преждевременному старению уже в возрасте 10–12 мес. У них наблюдались такие классические внешние проявления старения, как деминерализация костей, кифоз, катаракта и истончение кожи, высокий уровень карбонилированных белков, указывающий на повышение количества активных форм кислорода (ROS – reactive oxygen species), которые очень актуальны в онкологии и нейробиологии [69–71]. В отдельных органах были также обнаружены повышенные уровни маркеров старения (beta-gal, p19, p16). По-видимому, молекулярный механизм, лежащий в основе этих изменений, состоит в том, что белок p73 прямо регулирует на уровне транскрипции белок-мишень, а именно Cox4i1 [72].

Некоторые типы клеток, в том числе нейроны, удовлетворяют свои потребности в энергии с помощью окислительного фосфорилирования (OXPHOS – oxidative phosphorylation). В ходе этого процесса одна молекула глюкозы метаболизируется с образованием 30–32 молекул АТФ, что отличает этот путь от менее эффективного процесса гликолиза, в ходе которого образуются лишь 2 молекулы АТФ. Следовательно, окислительное фосфорилирование, протекающее в митохондриях в присутствии O_2, играет важную роль в нескольких процессах, от барьера на пути развития рака до нейрогенеза, ремоделирования цитоскелета, разрастания аксонов, дендритов и регуляции синаптической активности [73]. Важнейшим регулятором биогенеза митохондрий является белок NRF1 (ядерный респираторный фактор 1, nuclear respiratory factor 1), который, в свою очередь, активируется под действием белка PGC-1α (активированный пролифератором пероксисом рецепторный гамма коактиватор 1, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1). Нижележащий каскад метаболических реакций белка NRF1 включает в себя экспрессию митохондриальных белков, таких как митохондриальный фактор транскрипции A (TFAM – mitochondrial transcription factor A) и цитохром *c*. При этом PGC-1α регулирует развитие и гомеостаз синапсиса как в клетках развивающегося гиппокампа, так и в гиппокампе взрослых особей [74].

Некоторые онкогены и опухолевые супрессоры способны тонко регулировать активность митохондриальных белков. Вероятно, p73 также вносит свой вклад в эту регуляцию независимо от рецептора эстрогенов ERRα (oestrogen-related receptor alfa), ядерных респираторных факторов NRF1 и NRF2 и фактора транскрипции YY1 (yin yang 1). Удаление NRF2 вызывает ингибирование образования NSC из SGZ, а также ингибирование дифференцировки нейронов и гена предрасположенности к психическим заболеваниям *Cacna1c* (psychiatric susceptibility gene). Его отсутствие также способствует устойчивости митохондрий нейронов к окислительному стрессу [75, 76]. Собственно говоря, TAp73 прямо регулирует транскрипцию субъединицы 4 цитохром *c*-оксидазы (cox4i1), митохондриального белка, входящего в комплекс IV, имеющего важное значение для снабжения энергией как опухолевых клеток, так и нейронов [72].

Для развития нейронов и их дифференцировки необходимы значительные изменения метаболизма клеток [77, 78]: переключение аэробного гликолиза на окислительное фосфорилирование [79]. Этот процесс, идущий при прогрессировании рака в обратном направлении, включает в себя снижение экспрессии гексокиназы (HK2 – hexokinase) и лактатдегидрогеназы (LDHA – lactate dehydrogenase), а также переключение с процесса сплайсинга пируваткиназы 2 (PKM2 – pyruvate kinase 2) на сплайсинг PKM1, которое означает процесс переключения с NPC к нейрону. Более того, дифференцировка нейронов ассоциируется с повышенным биогенезом митохондрий, включая TFAM, ERRγ и PGC-1α. По мере увеличения массы нейронов также увеличивается масса митохондрий. Следовательно, усиленный биогенез митохондрий способствует пролиферации клеток, включая рост аксонов и образование отростков нейронов [79]. Глутамин является альтернативной аминокислотой, которая необходима для регуляции клеточного метаболизма. Он превращается в глутаминовую кислоту, далее в α-кетоглутаровую кислоту и затем окисляется в цикле трикарбоновых кислот (TCA – tricarboxylic acid) с конечным образованием АТФ. Конечная дифференцировка нейронов также ассоциируется с повышенным обменом глутамина, приводя к повышенной продукции нейромедиаторов, таких как глутаминовая кислота и гамма-аминомасляная кислота, и к повышению активности цикла трикарбоновых кислот [79]. Кроме того, по крайней мере в опухолевых клетках p73 контролирует метаболизм серина [80], а также глутаминолиз [81] и метаболизм ROS на уровне трансляции [82]. На рис. 3 суммированы данные о влиянии p73 на метаболизм клеток. Активность этих метаболических путей строго регулируется, чтобы гарантировать оптимальное снабжение клетки ресурсами, соответствующими функционированию клеток как при раке, так и при дифференцировке нейронов.

ВЫВОДЫ

Очевидно, что четыре модели нокаута сыграли решающую роль в выяснении физиологической роли p73 и молекулярных механизмов его действия. Результаты этих исследований способствуют включению данного белка в и без того сложную белковую сеть при прогрессировании рака [83–85]. В другой биохимической работе, не описанной нами здесь, была идентифицирована убиквитинлигаза E3, ответственная за деградацию белка p73 [86], которая была охарактеризована с помощью высокопроизводительного скрининга [87] и установлены её ингибиторы [88]. Данные, полученные *in vivo*,

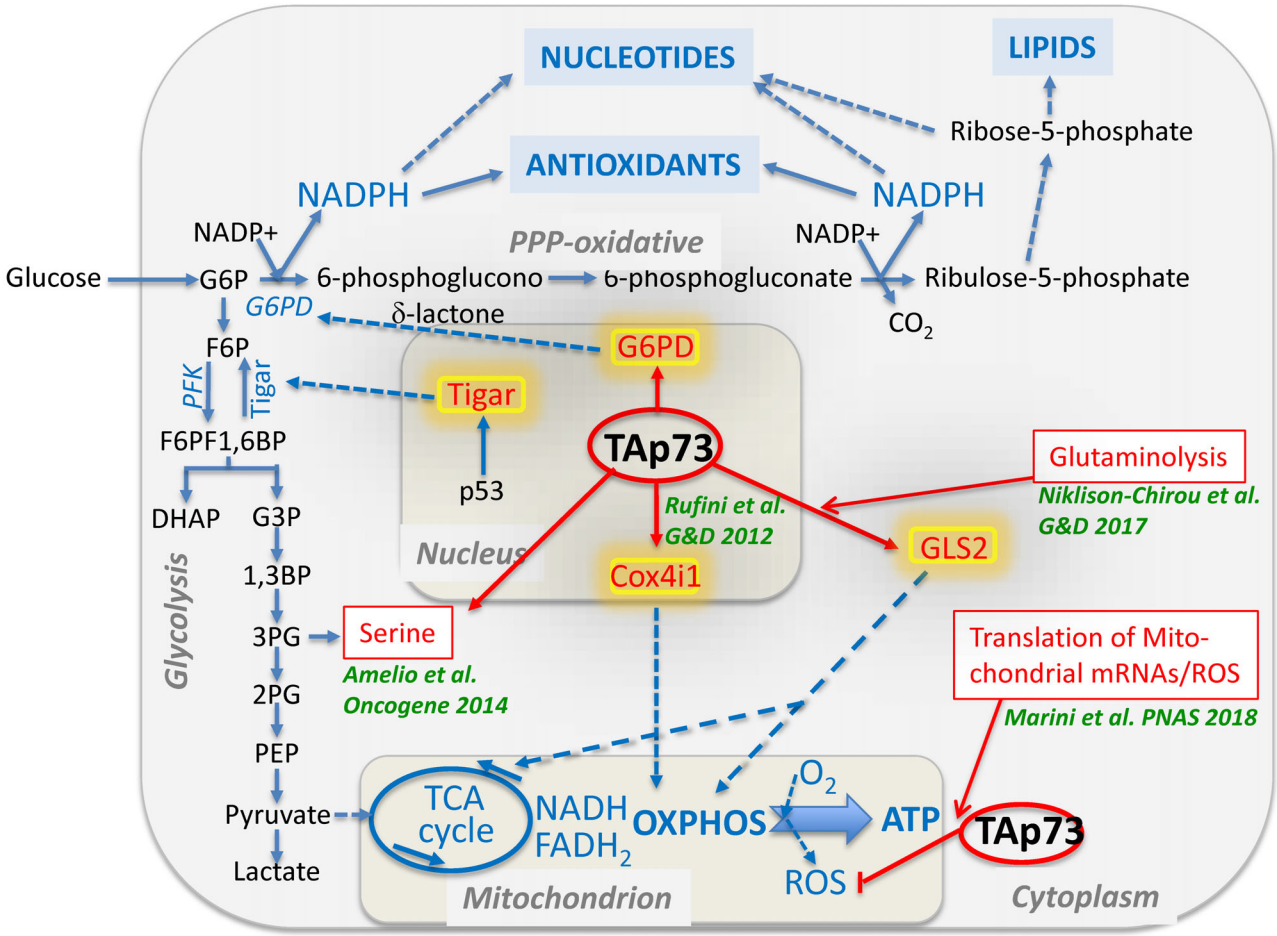


Рис. 3. Влияние p73 на метаболизм клетки. Упрощенная схема основных транскрипционных мишеней белка p73, ассоциированных с регуляцией метаболизма. Показаны основные мишени (Coxi1, G6PD, GLS2, биосинтез серина; см. текст настоящей статьи)

подтверждают важное значение гена, кодирующего p73, не только в процессе прогрессирования рака, но также в регуляции метаболизма, развитии ресничек и нейронов.

Финансирование. Эта работа была поддержана Associazione Italiana per la Ricerca contro il Cancro (AIRC) (грант IG#20473; 2018-2022), совместной программой сотрудничества Министерства здравоохранения Италии и MAECI и Министерства науки и технологий КНР (грант № #PGR00961) to GM & Eleonora Candi. Работа также была поддержана Regione Lazio through LazioInnova Progetto Gruppo di Ricerca (грант № 85-2017-14986).

Благодарности. Я благодарен доктору Карло Джанини за его конструктивные предложения.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Linzer, D. I. H., and Levine, A. J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell*, **17**, 43-52, doi: 10.1016/0092-8674(79)90293-9.
2. Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells, *Nature*, **278**, 261-263, doi: 10.1038/278261a0.
3. Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation, *Cell*, **57**, 1083-1093, doi: 10.1016/0092-8674(89)90045-7.
4. Candi, E., Cipollone, R., Rivetti di Val Cervo, P., Gonfloni, S., Melino, G., and Knight, R. (2008) p63 in epithelial development, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3126-3133, doi: 10.1007/s00018-008-8119-x.

5. Candi, E., Terrinoni, A., Rufini, A., Chikh, A., Lena, A. M., Suzuki, Y., Sayan, B. S., Knight, R. A., and Melino, G. (2006) p63 is upstream of IKK alpha in epidermal development, *J. Cell Sci.*, **119**, 4617-4622, doi: 10.1242/jcs.03265.
6. Shalom-Feuerstein, R., Lena, A. M., Zhou, H., de La Forest Divonne, S., van Bokhoven, H., Candi, E., Melino, G., and Aberdam, D. (2011) ΔNp63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis, *Cell Death Differ.*, **18**, 887-896, doi: 10.1038/cdd.2010.159.
7. Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysik, Z., and Espinosa, J. M. (2018) Mechanisms of transcriptional regulation by p53, *Cell Death Differ.*, **25**, 133-143, doi: 10.1038/cdd.2017.174.
8. Levrero, M., de Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Melino, G., and Wang, J. Y. (1999) Structure, function and regulation of p63 and p73, *Cell Death Differ.*, **6**, doi: 10.1038/SJ.CDD.4400624.
9. De Laurenzi, V., and Melino, G. (2000) Evolution of functions within the p53/p63/p73 family, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **926**, 90-100, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05602.x.
10. Candi, E., Agostini, M., Melino, G., and Bernassola, F. (2014) How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors, *Hum. Mut.*, **35**, 702-714, doi: 10.1002/humu.22523.
11. Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Rufini, A., Cheung, C. C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Tsao, M.-S., Iovanna, J. L., Squire, J., Jurisica, I., Kaplan, D., Melino, G., Jurisicova, A., and Mak, T. W. (2008) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions, *Genes Dev.*, **22**, 2677-2691, doi: 10.1101/gad.1695308.
12. Tomasini, R., Tsuchihara, K., Tsuda, C., Lau, S. K., Wilhelm, M., Rufini, A., Tsao, M., Iovanna, J. L., Jurisicova, A., Melino, G., and Mak, T. W. (2009) TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 797-802, doi: 10.1073/pnas.0812096106.
13. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death, *Cell Death Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
14. Melino, G., Knight, R. A., and Nicotera, P. (2005) How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ.*, **12 Suppl. 2**, 1457-1462, doi: 10.1038/sj.cdd.4401781.
15. Engeland, K. (2018) Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by P53: I have a DREAM, *Cell Death Differ.*, **25**, 114-132, doi: 10.1038/cdd.2017.172.
16. Wu, D., and Prives, C. (2018) Relevance of the p53-MDM2 axis to aging, *Cell Death Differ.*, **25**, 169-179, doi: 10.1038/cdd.2017.187.
17. Xu, R., Garcia-Barros, M., Wen, S., Li, F., Lin, C.-L., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., and Mao, C. (2018) Tumor suppressor p53 links ceramide metabolism to DNA damage response through alkaline ceramidase 2, *Cell Death Differ.*, **25**, 841-856, doi: 10.1038/s41418-017-0018-y.
18. Min, S., Kim, K., Kim, S.-G., Cho, H., and Lee, Y. (2018) Chromatin-remodeling factor, RSF1, controls p53-mediated transcription in apoptosis upon DNA strand breaks, *Cell Death Dis.*, **9**, 1079, doi: 10.1038/s41419-018-1128-2.
19. Contadini, C., Monteonofrio, L., Virdia, I., Prodosmo, A., Valente, D., Chessa, L., Musio, A., Fava, L. L., Rinaldo, C., di Rocco, G., and Soddu, S. (2019) p53 mitotic centrosome localization preserves centrosome integrity and works as sensor for the mitotic surveillance pathway, *Cell Death Dis.*, **10**, 850, doi: 10.1038/s41419-019-2076-1.
20. Mantovani, F., Collavin, L., and del Sal, G. (2019) Mutant p53 as a guardian of the cancer cell, *Cell Death Differ.*, **26**, 199-212, doi: 10.1038/s41418-018-0246-9.
21. Parrales, A., Thoenen, E., Iwakuma, T. (2018) The interplay between mutant p53 and the mevalonate pathway, *Cell Death Differ.*, **25**, 460-470, doi: 10.1038/s41418-017-0026-y.
22. Sorrentino, G., Mantovani, F., and del Sal, G. (2018) The stiff RhoAd from mevalonate to mutant p53, *Cell Death Differ.*, **25**, 645-647, doi: 10.1038/s41418-018-0091-x.
23. Kim, M. P., and Lozano, G. (2018) Mutant p53 partners in crime, *Cell Death Differ.*, **25**, 161-168, doi: 10.1038/cdd.2017.185.
24. Bailey, J. M., Hendley, A. M., Lafaro, K. J., Pruski, M. A., Jones, N. C., et al. (2016) p53 mutations cooperate with oncogenic Kras to promote adenocarcinoma from pancreatic ductal cells, *Oncogene*, **35**, 4282-4288, doi: 10.1038/onc.2015.441.
25. Pitolli, C., Wang, Y., Mancini, M., Shi, Y., Melino, G., and Amelio, I. (2019) Do mutations turn p53 into an oncogene? *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20246241.
26. Amelio, I., and Melino, G. (2015) The p53 family and the hypoxia-inducible factors (HIFs): determinants of cancer progression, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 425-434, doi: 10.1016/j.tibs.2015.04.007.
27. Amelio, I., Mancini, M., Petrova, V., Cairns, R. A., Vikhreva, P., et al. (2018) p53 mutants cooperate with HIF-1 in transcriptional regulation of extracellular matrix components to promote tumor progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E10869-E10878, doi: 10.1073/pnas.1808314115.
28. Amelio, I. (2019) How mutant p53 empowers Foxh1 fostering leukaemogenesis? *Cell Death Dis.*, **5**, 108, doi: 10.1038/s41420-019-0191-5.
29. Kaiser, A. M., and Attardi, L. D. (2018) Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression *in vivo*, *Cell Death Differ.*, **25**, 93-103, doi: 10.1038/cdd.2017.171.
30. Amelio, I., Inoue, S., Markert, E. K., Levine, A. J., Knight, R. A., Mak, T. W., and Melino, G. (2015) TAp73 opposes tumor angiogenesis by promoting hypoxia-inducible factor 1α degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 226-231, doi: 10.1073/pnas.1410609111.
31. Jacobs, W. B., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2006) The p53 family in nervous system development and disease, *J. Neurochem.*, **97**, 1571-1584, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03980.x.
32. Nemajerova, A., Amelio, I., Gebel, J., Dötsch, V., Melino, G., and Moll, U. M. (2018) Non-oncogenic roles of TAp73: from multiciliogenesis to metabolism, *Cell Death Differ.*, **25**, 144-153, doi: 10.1038/cdd.2017.178.
33. Billon, N., Terrinoni, A., Jolicoeur, C., McCarthy, A., Richardson, W. D., Melino, G., and Raff, M. (2004) Roles for p53 and p73 during oligodendrocyte development, *Development*, **131**, 1211-1220, doi: 10.1242/dev.01035.
34. Rogel, A., Popliker, M., Webb, C. G., and Oren, M. (1985) p53 cellular tumor antigen: analysis of MRNA lev-

els in normal adult tissues, embryos, and tumors, *Mol. Cell. Boil.*, **5**, 2851-2855, doi: 10.1128/mcb.5.10.2851.
35. Hooper, C., Meimaridou, E., Tavassoli, M., Melino, G., Lovestone, S., and Killick, R. (2007) p53 is upregulated in Alzheimer's disease and induces tau phosphorylation in HEK293a cells, *Neurosci. Lett.*, **418**, 34-37, doi: 10.1016/j.neulet.2007.03.026.
36. Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., and Caput, D. (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours, *Nature*, **404**, 99-103, doi: 10.1038/35003607.
37. Kawulok, J., Kawulok, M., and Deorovicz, S. (2019) Environmental metagenome classification for constructing a microbiome fingerprint, *Biol. Direct*, **14**, 20, doi: 10.1186/S13062-019-0251-Z.
38. Ryan, F. J. (2019) Application of machine learning techniques for creating urban microbial fingerprints, *Biol. Direct*, **14**, 13, doi: 10.1186/s13062-019-0245-x.
39. Zhu, C., Miller, M., Lusskin, N., Mahlich, Y., Wang, Y., Zeng, Z., and Bromberg, Y. (2019) Fingerprinting cities: differentiating subway microbiome functionality, *Biol. Direct*, **14**, 19, doi: 10.1186/s13062-019-0252-y.
40. Walker, A. R., Grimes, T. L., Datta, S., and Datta, S. (2018) Unraveling bacterial fingerprints of city subways from microbiome 16S gene profiles, *Biol. Direct*, **13**, 10, doi: 10.1186/s13062-018-0215-8.
41. Wilhelm, M. T., Rufini, A., Wetzel, M. K., Tsuchihara, K., Inoue, S., et al. (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway, *Genes Dev.*, **24**, 549-560, doi: 10.1101/gad.1873910.
42. Amelio, I., Panatta, E., Niklison-Chirou, M. V., Steinert, J. R., Agostini, M., Morone, N., Knight, R. A., and Melino, G. (2020) The C terminus of p73 is essential for hippocampal development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 15694-15701, doi: 10.1073/pnas.2000917117.
43. Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M., and Wang, J. Y. (1999) The tyrosine kinase C-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage, *Nature*, **399**, 806-809, doi: 10.1038/21690.
44. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., et al. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers, *Cell*, **90**, 809-819, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80540-1.
45. Suo, C., Deng, W., Vu, T. N., Li, M., Shi, L., and Pawitan, Y. (2018) Accumulation of potential driver genes with genomic alterations predicts survival of high-risk neuroblastoma patients, *Biol. Direct*, **13**, 14, doi: 10.1186/s13062-018-0218-5.
46. Pieraccioli, M., Nicolai, S., Pitolli, C., Agostini, M., Antonov, A., Malewicz, M., Knight, R. A., Raschellà, G., and Melino, G. (2018) ZNF281 inhibits neuronal differentiation and is a prognostic marker for neuroblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 7356-7361, doi: 10.1073/pnas.1801435115.
47. Han, Y., Ye, X., Wang, C., Liu, Y., Zhang, S., Feng, W., Huang, K., and Zhang, J. (2019) Integration of molecular features with clinical information for predicting outcomes for neuroblastoma patients, *Biol. Direct*, **14**, 16, doi: 10.1186/s13062-019-0244-y.
48. Polewko-Klim, A., Lesiński, W., Mnich, K., Piliszek, R., and Rudnicki, W. R. (2018) Integration of multiple types of genetic markers for neuroblastoma may contribute to improved prediction of the overall survival, *Biol. Direct*, **13**, 17, doi: 10.1186/s13062-018-0222-9.
49. Han, Y., Ye, X., Cheng, J., Zhang, S., Feng, W., Han, Z., Zhang, J., and Huang, K. (2019) Integrative analysis based on survival associated co-expression gene modules for predicting neuroblastoma patients' survival time, *Biol. Direct*, **14**, 4, doi: 10.1186/S13062-018-0229-2.
50. Francescatto, M., Chierici, M., Rezvan Dezfooli, S., Zandonà, A., Jurman, G., and Furlanello, C. (2018) Multi-omics integration for neuroblastoma clinical endpoint prediction, *Biol. Direct*, **13**, 5, doi: 10.1186/s13062-018-0207-8.
51. Hidalgo, M. R., Amadoz, A., Çubuk, C., Carbonell-Caballero, J., and Dopazo, J. (2018) Models of cell signaling uncover molecular mechanisms of high-risk neuroblastoma and predict disease outcome, *Biol. Direct*, **13**, 16, doi: 10.1186/s13062-018-0219-4.
52. Baali, I., Acar, D. A. E., Aderinwale, T. W., HafezQorani, S., and Kazan, H. (2018) Predicting clinical outcomes in neuroblastoma with genomic data integration, *Biol. Direct*, **13**, 20, doi: 10.1186/s13062-018-0223-8.
53. Tranchevent, L.-C., Nazarov, P. V., Kaoma, T., Schmartz, G. P., Muller, A., Kim, S.-Y., Rajapakse, J. C., and Azuaje, F. (2018) Predicting clinical outcome of neuroblastoma patients using an integrative network-based approach, *Biol. Direct*, **13**, 12, doi: 10.1186/s13062-018-0214-9.
54. Grimes, T., Walker, A. R., Datta, S., and Datta, S. (2018) Predicting survival times for neuroblastoma patients using RNA-seq expression profiles, *Biol. Direct*, **13**, 11, doi: 10.1186/s13062-018-0213-x.
55. Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., and Raschellà, G. (2017) Zinc-finger proteins in health and disease, *Cell Death Discov.*, **3**, 17071, doi: 10.1038/cddiscovery.2017.71.
56. Niklison-Chirou, M. V., Killick, R., Knight, R. A., Nicotera, P., Melino, G., and Agostini, M. (2016) How does p73 cause neuronal defects? *Mol. Neurobiol.*, **53**, 4509-4520, doi: 10.1007/s12035-015-9381-1.
57. Killick, R., Niklison-Chirou, M., Tomasini, R., Bano, D., Rufini, A., et al. (2011) p73: a multifunctional protein in neurobiology, *Mol. Neurobiol.*, **43**, 139-146, doi: 10.1007/s12035-011-8172-6.
58. Sayan, B. S., Yang, A. L., Conforti, F., Tucci, P., Piro, M. C., Browne, G. J., Agostini, M., Bernardini, S., Knight, R. A., Mak, T. W., and Melino, G. (2010) Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12877-12882, doi: 10.1073/pnas.0911828107.
59. Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G. (2014) Serine and glycine metabolism in cancer, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 191-198, doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.004.
60. Niklison-Chirou, M. V., Steinert, J. R., Agostini, M., Knight, R. A., Dinsdale, D., Cattaneo, A., Mak, T. W., and Melino, G. (2013) TAp73 knockout mice show morphological and functional nervous system defects associated with loss of p75 neurotrophin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 18952-18957, doi: 10.1073/pnas.1221172110.
61. Agostini, M., Tucci, P., Steinert, J. R., Shalom-Feuerstein, R., Rouleau, M., et al. (2011) MicroRNA-34a

regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 21099-21104, doi: 10.1073/pnas.1112063108.
62. Agostini, M., Tucci, P., Killick, R., Candi, E., Sayan, B. S., et al. (2011) Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 21093-21098, doi: 10.1073/pnas.1112061109.
63. Fuertes-Alvarez, S., Maeso-Alonso, L., Villoch-Fernandez, J., Wildung, M., Martin-Lopez, M., et al. (2018) p73 regulates ependymal planar cell polarity by modulating actin and microtubule cytoskeleton, *Cell Death Dis.*, **9**, 1183, doi: 10.1038/s41419-018-1205-6.
64. Hochgerner, H., Zeisel, A., Lönnerberg, P., and Linnarsson, S. (2018) Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing, *Nat. Neurosci.*, **21**, 290-299, doi: 10.1038/s41593-017-0056-2.
65. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of Hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
66. Rogaev, E. I. (2018) Different pathways to neurodegeneration, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1007-1008, doi: 10.1134/S0006297918090018.
67. Nemajerova, A., Kramer, D., Siller, S. S., Herr, C., Shomroni, O., et al. (2016) TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis, *Genes Dev.*, **30**, 1300-1312, doi: 10.1101/gad.279836.116.
68. Buckley, N., Panatta, E., Morone, N., Noguchi, M., Scorrano, L., Knight, R. A., Amelio, I., and Melino, G. (2020) p73 C-terminus is dispensable for multiciliogenesis, *Cell Cycle*, **19**, 1833-1845, doi: 10.1080/15384101.2020.1783055.
69. Kalinina, E. V., Ivanova-Radkevich, V. I., and Chernov, N. N. (2019) Role of microRNAs in the regulation of redox-dependent processes, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1233-1246, doi: 10.1134/S0006297919110026.
70. Korshunov, D. A., Kondakova, I. V., and Shashova, E. E. (2019) Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1129-1142, doi: 10.1134/S000629791910002X.
71. Kobliakov, V. A. (2019) The mechanisms of regulation of aerobic clycolysis (Warburg effect) by oncoproteins in carcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1117-1128, doi: 10.1134/S0006297919100018.
72. Rufini, A., Niklison-Chirou, M. V., Inoue, S., Tomasini, R., Harris, I. S., et al. (2012) TAp73 depletion accelerates aging through metabolic dysregulation, *Genes Dev.*, **26**, 2009-2014, doi: 10.1101/gad.197640.112.
73. Garrido-Maraver, J., Celardo, I., Costa, A. C., Lehamann, S., Loh, S. H. Y., and Martins, L. M. (2019) Enhancing folic acid metabolism suppresses defects associated with loss of *Drosophila* mitofusin, *Cell Death Dis.*, **10**, doi: 10.1038/S41419-019-1496-2.
74. Cheng, A., Wan, R., Yang, J.-L., Kamimura, N., Son, T. G., Ouyang, X., Luo, Y., Okun, E., and Mattson, M. P. (2012) Involvement of PGC-1α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines, *Nat. Commun.*, **3**, 1250, doi: 10.1038/ncomms2238.
75. Michels, S., Ganjam, G. K., Martins, H., Schratt, G. M., Wöhr, M., Schwarting, R. K. W., and Culmsee, C. (2018) Downregulation of the psychiatric susceptibility gene *Cacna1c* promotes mitochondrial resilience to oxidative stress in neuronal cells, *Cell Death Discov.*, **4**, 54, doi: 10.1038/s41420-018-0061-6.
76. Galkin, A. (2019) Brain ischemia/reperfusion injury and mitochondrial complex I damage, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1411-1423, doi: 10.1134/S0006297919110154.
77. Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M., and Renard, P. (2015) Connecting mitochondria, metabolism, and stem cell fate, *Stem Cells Dev.*, **24**, 1957-1971, doi: 10.1089/scd.2015.0117.
78. Khacho, M., and Slack, R. S. (2017) Mitochondrial activity in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **49**, 1-8, doi: 10.1016/j.ceb.2017.11.003.
79. Agostini, M., Romeo, F., Inoue, S., Niklison-Chirou, M. V., Elia, A. J., Dinsdale, D., Morone, N., Knight, R. A., Mak, T. W., and Melino, G. (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation, *Cell Death Differ.*, **23**, 1502-1514, doi: 10.1038/cdd.2016.36.
80. Amelio, I., Markert, E. K., Rufini, A., Antonov, A. V., Sayan, B. S., Tucci, P., Agostini, M., Mineo, T. C., Levine, A. J., and Melino, G. (2014) p73 regulates serine biosynthesis in cancer, *Oncogene*, **33**, 5039-5046, doi: 10.1038/onc.2013.456.
81. Niklison-Chirou, M. V., Erngren, I., Engskog, M., Haglöf, J., Picard, D., Remke, M., et al. (2017) TAp73 is a marker of glutamine addiction in medulloblastoma, *Genes Dev.*, **31**, 1738-1753, doi: 10.1101/gad.302349.117.
82. Marini, A., Rotblat, B., Sbarrato, T., Niklison-Chirou, M. V., Knight, J. R. P., et al. (2018) TAp73 contributes to the oxidative stress response by regulating protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 6219-6224, doi: 10.1073/pnas.1718531115.
83. Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Kaigorodova, E. V., Krakhmal, N. V., and Perelmuter, V. M. (2019) Intravasation as a key step in cancer metastasis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 762-772, doi: 10.1134/S0006297919070071.
84. Zamyatnin, A. A. (2019) Thematic issue: immuno-oncology and immunotherapy, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 693-694, doi: 10.1134/S0006297919070010.
85. Sverdlov, E. D., and Chernov, I. P. (2019) Cancer stem complex, not a cancer stem cell, is the driver of cancer evolution, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1028-1039, doi: 10.1134/S0006297919090050.
86. Rossi, M., de Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D. R., Liu, Y.-C., Vousden, K. H., Cesareni, G., and Melino, G. (2005) The ubiquitin-protein ligase itch regulates p73 stability, *EMBO J.*, **24**, 836-848, doi: 10.1038/sj.emboj.7600444.
87. Rossi, M., Rotblat, B., Ansell, K., Amelio, I., Caraglia, M., Misso, G., Bernassola, F., Cavasotto, C. N., Knight, R. A., Ciechanover, A., and Melino, G. (2014) High throughput screening for inhibitors of the HECT ubiquitin E3 ligase ITCH identifies antidepressant drugs as regulators of autophagy, *Cell Death Dis.*, **5**, e1203-e1203, doi: 10.1038/cddis.2014.113.
88. Rossi, M., Munarriz, E. R., Bartesaghi, S., Milanese, M., Dinsdale, D., et al. (2009) Desmethylclomipramine induces the accumulation of autophagy markers by blocking autophagic flux, *J. Cell Sci.*, **122**, 3330-3339, doi: 10.1242/jcs.048181.

MOLECULAR MECHANISMS AND FUNCTION OF THE p53 FAMILY MEMBER p73

Mini-review

G. Melino

Department of Experimental Medicine, TOR, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy; E-mail: melino@uniroma2.it

Received August 14, 2020
Revised August 14, 2020
Accepted August 19, 2020

Over 20 years after identification of p53 and its crucial function in cancer progression, two members of the same protein family were identified, namely p63 and p73. Since then, a body of information has been accumulated on each of these genes and their interrelations. Biological role of p73 has been elucidated thanks to four distinct knockout mice models: (i) with deletion of the entire *TP73* gene, (ii) with deletion of exons encoding the full length TAp73 isoforms, (iii) with deletions of exons encoding the shorter DNp73 isoform, and (iv) with deletion of exons encoding C-terminal of the alpha isoform. This work, as well as expression studies in cancer and overwhelming body of molecular studies, allowed establishing major role of *TP73* both in cancer and in neuro-development, as well as ciliogenesis, and metabolism. Here, we recapitulate the major milestones of this endeavor.

Keywords: p53, p53 family, p73, cancer, ciliogenesis, metabolism, neurobiology

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1421 – 1441

УДК 577.24

ТАРГЕТИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Bcl-2: ЧТО, ГДЕ, КОГДА?

Обзор

© 2020 В.В. Сеничкин[1], Н.В. Первушин[1], А.П. Зуев[1], Б. Животовский[1,2], Г.С. Копеина[1]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lirroster@gmail.com*

[2] *Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, 17177 Стокгольм, Швеция*

Поступила в редакцию 15.07.2020
После доработки 15.07.2020
Принята к публикации 08.08.2020

Белки семейства Bcl-2 являются регуляторами апоптоза, одного из наиболее изученных типов программируемой клеточной гибели. Данное семейство белков представлено как про-, так и антиапоптотическими членами. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 нередко используются опухолевыми клетками в качестве механизма устойчивости к гибели, играя важную роль как в процессе возникновения онкологических заболеваний, так и в приобретении злокачественными клетками резистентности к терапевтическим воздействиям. Следовательно, эти белки представляют собой привлекательные мишени для противоопухолевой терапии. Детальное изучение взаимодействий между Bcl-2 белками, лежащих в основе регуляции запуска апоптоза, позволило сделать существенный прорыв в разработке высокоселективных ингибиторов отдельных антиапоптотических представителей семейства. В настоящее время данные вещества активно изучают на доклинических и клинических стадиях, и большим прорывом можно считать одобрение для медицинского применения Венетоклакса, селективного ингибитора белка Bcl-2. Подавление активности антиапоптотических белков Bcl-2 семейства обладает существенным терапевтическим потенциалом, который только предстоит раскрыть. В грядущую эру персонализированной медицины необходимо детальное изучение механизмов, ответственных за чувствительность или резистентность опухолевых клеток к различным терапевтическим агентам, а также подбор наиболее эффективных комбинаций. В обзоре рассмотрены существующие сведения о фундаментальных основах функционирования белков семейства Bcl-2, принципах их ингибирования с помощью малых молекул, успехах такого подхода в противоопухолевой терапии и, наконец, биохимических особенностях, которые могут послужить основой для дальнейшего совершенствования использования ингибиторов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в терапии опухолевых заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, Bcl-2 семейство, противоопухолевая терапия, BH3-миметики.

DOI: 10.31857/S0320972520100097

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ключевых задач современной медицины является борьба с опухолевыми заболеваниями. В основе биологии опухолевых клеток лежат принципы отбора в пользу наиболее приспособленных к выживанию клонов. В результате такие клоны характеризуются рядом приобретенных адаптационных преимуществ, в том числе, устойчивостью к программируемой клеточной гибели (ПКГ) [1]. Одним из наиболее изученных типов ПКГ в настоящее время является апоптоз, представляющий собой, среди прочего, важный онкосупрессорный механизм [1].

Наиболее изученными способами запуска апоптотической гибели на молекулярном уровне являются внутренний (митохондриальный) и внешний (рецептор-зависимый) пути индукции апоптоза. Внешний путь запуска апоптотической программы реализуется, в частности, в результате связывания соответствующих лигандов (например, TNF-α, FAS-L) с «рецепторами смерти» на поверхности клетки, что ведет к активации каспазного каскада и последующей элиминации клетки [2]. В реализации внутреннего пути индукции апоптоза задействованы митохондрии, в межмембранном пространстве которых в норме локализуются различные проапоптотические факторы, выполняющие не связанные с апоптозом функции, – цитохром *c*, SMAC/DIABLO и другие. Попадание данных

Принятые сокращения: BH-домен – домен гомологии белков Bcl-2; ММ – множественная миелома; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз.

* Адресат для корреспонденции.

факторов в цитоплазму также ведет к запуску каспазного каскада и последующей гибели клеток, потому целостность внешней митохондриальной мембраны находится под строгим контролем белков семейства Bcl-2 [3].

Эти белки, хотя и обладают существенной степенью гомологии друг с другом, подразделяются на две функциональные подгруппы со строго противоположной ролью. Одни представители данного семейства способствуют пермеабилизации внешней митохондриальной мембраны (ПВММ), проявляя проапоптотические свойства, другие препятствуют функциональной активности проапоптотических Bcl-2 белков, тем самым проявляя антиапоптотическую активность. Регуляция как про-, так и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 может быть нарушена в опухолевых клетках, что может вести к их повышенной устойчивости к апоптотическим стимулам. Особенно часто опухолевые клетки используют повышенную экспрессию антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в качестве механизма приобретения устойчивости к апоптозу [3].

Данный факт повышает интерес к этим белкам как к мишеням для терапевтического воздействия. За последние 15 лет был разработан ряд ингибиторов антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Некоторые из них только недавно вступили в фазу клинических испытаний (в частности, ингибиторы Mcl-1) [4]. Ингибирование другой мишени, Bcl-xL, вело к выраженным побочным эффектам [5], что стало большой проблемой для дальнейших клинических испытаний селективных антагонистов данного белка. В то же время имеются и существенные успехи в таргетировании антиапоптотических белков этого семейства, в частности, к таковым относится одобрение Венетоклакса для лечения пациентов с рядом гематологических заболеваний [6].

Тем не менее, следует отметить, что, хотя устойчивость к апоптозу и является широко распространенным явлением для различных типов опухолей, Венетоклакс в настоящее время имеет скорее ограниченное применение, в особенности, в случае монотерапии. То же, вполне вероятно, может ожидать и другие ингибиторы антиапоптотических Bcl-2-белков в случае их одобрения к медицинскому применению. Эта проблема во многом отражает недостаточность наших знаний о том, как наиболее рационально использовать ингибиторы данных белков для элиминирования опухолевых клеток. Наиболее важным представляется расширение наших знаний о механизмах, отвечающих за повышенную чувствительность или, напротив, устойчивость опухолевых клеток к действию ингибиторов Bcl-2-белков. Также особенно остро стоит вопрос подбора комбинаций, которые могут проявлять существенный синергизм в элиминации опухолевых клеток.

В настоящей работе мы предприняли попытку ответа на три основных вопроса, касающихся ингибирования антиапоптотических Bcl-2-белков. 1) Что? Что из себя представляют антагонисты данных белков и каков их основной механизм действия; 2) Где? В каких опухолях ингибирование тех или иных антиапоптотических белков представляется особенно эффективным, какие механизмы могут лежать в основе описываемых феноменов и как эти знания могут быть использованы для дальнейших исследований; 3) Когда? В каких случаях могут быть использованы те или иные антагонисты антиапоптотических белков Bcl-2, а именно, каковы прогностические факторы чувствительности/устойчивости к этим веществам, каковы наиболее перспективные комбинации данных веществ с другими препаратами и, наконец, какие механизмы лежат в основе этих наблюдений.

ЧТО: БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА Bcl-2 КАК МИШЕНИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Контроль запуска внутреннего пути апоптоза белками семейства Bcl-2. Ключевым событием и одновременно точкой невозврата в запуске внутреннего пути апоптоза является выход из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму различных проапоптотических факторов [3]. В основе данного феномена лежит ПВММ за счет образования белковых пор во внешней мембране митохондрий. Этот процесс осуществляется путем олигомеризации порообразующих белков-эффекторов семейства Bcl-2 – Bak и Bax [7]. В норме эти белки находятся в виде мономеров: Bak – на поверхности внешней митохондриальной мембраны, Bax – в цитоплазме [3]. Активация порообразующих белков Bak и Bax ведет к их димеризации, а образующиеся димеры далее олигомеризуются на поверхности внешней мембраны митохондрий, образуя поры.

Вторая группа проапоптотических белков семейства Bcl-2 включает BH3-only белки (Bim, Puma, Noxa, Bad и другие), состоящие из одного (BH3) домена гомологии белков Bcl-2 (BH). Некоторые из них, т.н. «BH3-only активаторы», связываясь с порообразующими белками Bcl-2 семейства Bak и Bax, способны вести к их активации [8]. В то же время некоторые из BH3-only белков, т.н. «BH3-only сенситайзеры», напря-

мую не взаимодействуют с порообразующими белками. Проапоптотическая активность этой подгруппы белков осуществляется только за счет взаимодействия с антиапоптотическими белками Bcl-2 семейства и их нейтрализации. Важно отметить, что BH3-only активаторы также ингибируют антиапоптотические Bcl-2-белки [8]. Таким образом, нейтрализация антиапоптотических белков Bcl-2 семейства – общий механизм проапоптотической активности BH3-only белков независимо от их способности напрямую активировать порообразующие белки Bak и Bax.

Наконец, антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-A1) связывают и нейтрализуют проапоптотические белки – как порообразующие, так и BH3-only [3]. Как итог, три функциональные группы белков семейства Bcl-2 образуют трехстороннюю систему контроля над ПВММ: белки-эффекторы непосредственно образуют поры в наружной мембране митохондрий, тогда как BH3-only и антиапоптотические белки регулируют активность порообразующих белков. В основе ингибирующих взаимодействий между представителями Bcl-2 семейства лежит способность белков одной функциональной подгруппы связывать белки другой функциональной подгруппы. Таким образом, белки физически нейтрализуют друг друга, образуя гетеродимеры, а их активирующие функции реализуются только взаимодействием BH3-only активаторов с порообразующими Bak и Bax, что способствует димеризации последних [3].

Каковы механизмы взаимодействия белков семейства Bcl-2? Порообразующие и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 имеют в своем строении четыре BH-домена – BH1–BH4, которые участвуют в формировании глобулярной структуры данных белков [3]. В структуре BH3-only белков присутствует только домен BH3, откуда эта подгруппа белков и получила свое название. Именно данный домен наделяет белки проапоптотической активностью [8]. В структуре глобулярных белков, как порообразующих, так и антиапоптотических, домен BH3 совместно с другими BH-доменами принимает участие

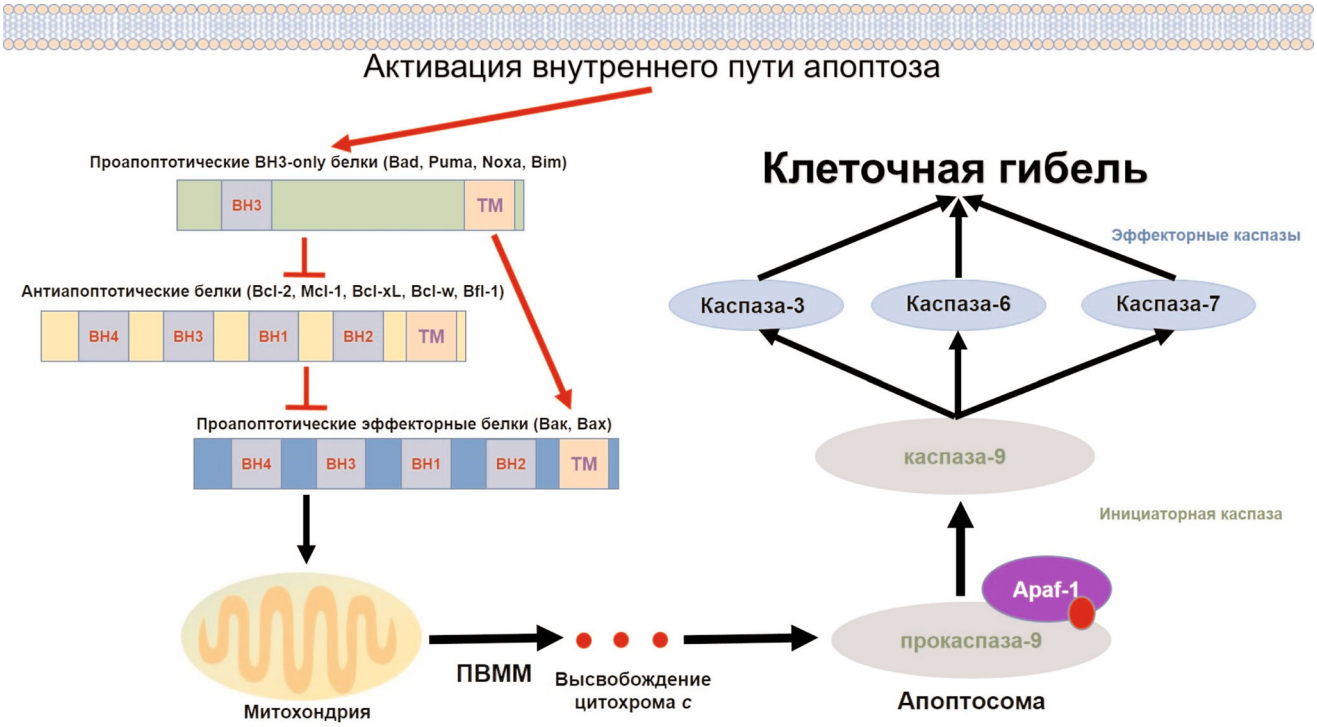


Рис. 1. Активация внутреннего пути апоптоза и схема строения членов белкового семейства Bcl-2. Различные стимулы (например, повреждения ДНК, депривация ростовых факторов или действие химиотерапевтических препаратов) могут вести к активации внутреннего пути апоптоза. Проапоптотические BH3-only белки приводят к нейтрализации действия антиапоптотических белков и/или прямой активации проапоптотических эффекторных белков. В результате действия белков Bak и Bax наблюдается ПВММ за счет образования белковых пор на поверхности внешней мембраны митохондрий. Высвобождение из межмембранного пространства цитохрома *c* приводит к образованию в цитоплазме апоптосомы – комплекса активации инициаторной каспазы-9 (при участии цитозольного белка Apaf-1 и за счет энергии АТФ). Каспаза-9 ведет к дальнейшей активации каспазного каскада и гибели клеток за счет действия эффекторных каспаз.

в формировании гидрофобного кармана – углубления на поверхности белка, способного связываться с экспонированными BH3-доменами других белков. Отсюда данная структура получила название «BH3-связывающий карман». Проапоптотические Bax и Bak способны экспонировать свой BH3-связывающий домен, сохраняя при этом структуру BH3-связывающего кармана. Подобный конформационный переход может происходить при связывании порообразующими белками BH3-only активаторов [9]. В подобной активированной конфигурации белки Bax и Bak димеризуются за счет взаимодействий BH3-домен – BH3-связывающий карман, что служит подспорьем для дальнейшей олигомеризации и процесса ПВММ. Антиапоптотические белки не экспонируют свои BH3-домены, что является их принципиальным отличием от порообразующих белков. Вместо этого антиапоптотические белки нейтрализуют BH3-only белки или активированные Bak и Bax за счет связывания их экспонированных BH3-доменов (рис.1) [3]. Описанные взаимодействия между BH3-доменами и BH3-связывающими карманами лежат в основе функционирования представителей семейства Bcl-2 и были использованы для создания терапевтических подходов, нацеленных на данные белки [10].

Чем больше уровень антиапоптотических белков в клетке, тем активнее при прочих равных они будут связывать активированные белки Bak и Bax, препятствуя их димеризации и процессу ПВММ. Дополнительно антиапоптотические белки способны снижать и уровень свободных BH3-only активаторов, которые могли бы вызвать димеризацию Bak и Bax. Напротив, при повышении уровня BH3-only белков большее количество антиапоптотических белков будет связываться с ними, освобождая, во-первых, Bak и Bax, во-вторых, BH3-only активаторы, способствуя дополнительной активации Bak и Bax [11]. Помимо изменений концентрации в клетке, активность анти- и проапоптотических белков семейства Bcl-2 регулируется за счет их посттрансляционных модификаций, что может повышать их сродство к партнерам связывания или вести к изменениям внутриклеточной локализации [12]. Таким образом, в описанной системе трехстороннего контроля над ПВММ порообразующие белки являются исполнителями, тогда как BH3-only и антиапоптотические белки регулируют их активность и, следовательно, готовность клетки перейти к точке невозврата в запуске программы апоптоза.

Роль белков семейства Bcl-2 в канцерогенезе. Учитывая роль апоптоза в противоопухолевой защите организма, логично предположить, что опухолевые клетки могут использовать нарушения в функционировании проапоптотических белков и оверэкспрессию антиапоптотических белков для повышения устойчивости к апоптозу. Действительно, ряд имеющихся данных подтверждает подобное предположение. Так, у пациентов с лимфомой Бёркитта наблюдается гиперметилирование промотора гена *BCL2L11* [13], кодирующего BH3-only белок Bim, а у пациентов с мантийноклеточной лимфомой – гомозиготная делеция локуса 2q13 [14], содержащего этот же ген. Мутации, ведущие к сдвигу рамки считывания в гене *BAX*, кодирующем одноименный белок, были обнаружены у пациентов с колоректальным раком с микросателлитной нестабильностью [15]. Многочисленные эксперименты на опухолевых клеточных линиях демонстрируют значимость нарушений функционирования проапоптотических белков для приобретения устойчивости к апоптозу, индуцированному противоопухолевыми агентами [16]. Наконец, была показана корреляция между уровнем проапоптотических белков и прогнозом пациентов при лечении различными препаратами [17].

Одним из наиболее ярких примеров использования опухолевыми клетками антиапоптотических белков является оверэкспрессия Bcl-2 у пациентов с фолликулярной лимфомой. Причиной повышенного уровня Bcl-2 является транслокация t (14;18), в результате которой ген *BCL2* попадает в транскрипционно-активный участок на хромосоме 14, содержащий гены тяжелых цепей иммуноглобулина. Подобная транслокация наблюдается у ~90% пациентов с фолликулярной лимфомой. Помимо этого, при опухолевых заболеваниях могут происходить амплификации генов антиапоптотических белков Bcl-2 семейства, в частности, *BCL2*, *MCL1*, *BCL2L1* (последний кодирует Bcl-xL) [18]. Высокая экспрессия этих белков наблюдается у пациентов с различными онкологическими заболеваниями [19], при этом показана корреляция уровня их экспрессии с отрицательным прогнозом пациентов [20, 21]. Все эти данные подчеркивают значимость апоптоза как противоопухолевого механизма и указывают на перспективность использования белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

Следует отметить, что в ряде случаев наблюдаются обратные результаты. Так, согласно мета-анализу, пациенты с позитивным по Bcl-2 немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) имеют более благоприятный прогноз в сравнении с пациентами с негативными по Bcl-2 случаями того же заболевания, хотя разницы между двумя группами не наблюдалось среди пациентов

только с I стадией [22]. У пациентов с раком яичника уровень экспрессии гена *BCL2* прямо коррелирует с благоприятным прогнозом [23]. В то же время уровень Bcl-2 у больных с раком яичника обратно коррелирует со стадией прогрессии опухоли, что может в существенной степени объяснять наблюдаемый феномен [24]. Более того, низкий уровень экспрессии гена одного антиапоптотического белка вовсе не исключает того, что опухоль данного типа может использовать повышенную экспрессию генов других антиапоптотических белков для выживания. Так, для НМРЛ была показана значимость Mcl-1 и его связь с неблагоприятным прогнозом [25], а для рака яичника установлено значение Bcl-xL и Mcl-1 в устойчивости к химиотерапии [26, 27]. Следовательно, тот или иной белок может иметь бóльшую роль в одних типах опухолевых заболеваний и меньшую – в других.

Таргетирование BH3-миметиками. Учитывая то, что опухолевые клетки нередко характеризуются нарушениями процессов клеточной гибели, запуск апоптоза представляется перспективным подходом в контексте противоопухолевой терапии. Теоретически воздействовать на регуляцию ПВММ белками семейства Bcl-2 можно по меньшей мере двумя способами. Во-первых, возможно создание молекул, которые напрямую активировали бы Bax и Bak аналогично BH3-only активаторам [10]. Во-вторых, можно ингибировать антиапоптотические белки семейства Bcl-2, что смещало бы равновесие в клетке к активности проапоптотических белков [3]. В настоящее время первый из упомянутых подходов находится лишь на стадии подбора эффективных кандидатов для прямой активации Bax и Bak [28]. Вместе с тем один из главных вопросов, касающийся подобной стратегии, заключается в селективности подхода, т.е. в том, не будут ли прямые активаторы порообразующих белков токсичны за счет массовой индукции апоптоза в клетках нормальных тканей. Дальнейшие исследования должны дать ответ на этот и другие вопросы, касающиеся возможности прямой активации Bax и Bak в качестве терапевтической стратегии.

Второй подход в таргетировании белков семейства Bcl-2 – ингибирование антиапоптотических представителей данного семейства – добился существенного прогресса за последние 15 лет. Главным инструментом в ингибировании анти-апоптотической активности Bcl-2-белков стали вещества, имитирующие действие BH3-доменов проапоптотических белков, откуда они и получили свое название – BH3-миметики [29, 30]. Взаимодействуя с BH3-связывающим карманом антиапоптотических белков, BH3-миметики разрушают их комплексы с проапоптотическими представителями Bcl-2 семейства, напрямую вызывая апоптоз [29]. При этом при ингибировании антиапоптотических белков возможно достичь определенной степени избирательности в отношении опухолевых клеток, что обусловлено, вероятно, их высокой склонностью к апоптозу и зависимостью от отдельных белков семейства Bcl-2 для выживания.

Учитывая принципиальное сходство BH3-связывающих карманов различных антиапоптотических белков, некоторые малые молекулы могут взаимодействовать с несколькими из них. Такие BH3-миметики широкого спектра действия (например, Обатоклакс) используются как инструмент индукции апоптоза в экспериментах *in vitro*. Они показали некоторую эффективность в испытаниях *in vivo* и были протестированы в клинических испытаниях, где, впрочем, не продемонстрировали существенной эффективности [31]. С развитием методов дизайна химических веществ появились более селективные BH3-миметики [30, 32, 33]. Существенным преимуществом данных агентов в сравнении с неселективными BH3-миметиками, во-первых, является возможность изучить вклад индивидуальных белков в выживаемость опухолевых и нормальных клеток в различных условиях. Во-вторых, селективные BH3-миметики представляют собой перспективные противоопухолевые препараты, так как позволяют целенаправленно ингибировать необходимый белок, а в случае необходимости заблокировать несколько антиапоптотических представителей Bcl-2 семейства, дозы каждого из селективных BH3-миметиков могут быть подобраны индивидуально в соответствии с тем, от каких белков в наибольшей степени зависит выживаемость опухолевых клеток в конкретном случае.

Среди антиапоптотических белков семейства Bcl-2 наиболее изучены пять членов: Bfl-1, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 [11]. Для каждого из этих белков показана роль в выживании опухолевых клеток, следовательно, все из них являются потенциальными мишенями для действия BH3-миметиков. Вместе с тем в настоящее время прогресс в разработке и применении ингибиторов данных белков существенно разнится.

Таргетирование белка Bcl-2. Белок Bcl-2 стал не только первым открытым представителем одноименного семейства, но и очевидным лидером среди указанных белков в контексте подбора ингибиторов и их использования в медицинской практике. Существенным прорывом в ингибировании Bcl-2 послужило получение BH3-миметиков ABT-737 и ABT-263 (Навитоклакс) [34,35]. Указанные соединения, помимо Bcl-2,

также подавляли Bcl-w и Bcl-xL, хотя некоторые исследования указывали на то, что именно Bcl-2 является их основной мишенью в клетках [36]. Обладая, в отличие от АВТ-737, подходящими фармакологическими свойствами (в частности, возможностью перорального применения) [35], Навитоклакс был исследован в ряде клинических испытаний [5,10]. Однако выраженная тромбоцитопения, обусловленная ингибированием Bcl-xL, привела к ограничению максимальной дозы Навитоклакса и лишь умеренной терапевтической эффективности [5].

Дальнейшие попытки разработчиков были сосредоточены на создании BH3-миметика, который селективно подавлял бы Bcl-2. Первым таким соединением стал АВТ-199 (Венетоклакс), обладающий сходной структурой с АВТ-737 и Навитоклаксом [30]. В то же время введение индольного фрагмента в структуру Венетоклакса позволило обеспечить селективность взаимодействия с Bcl-2 за счет образования водородной связи с остатком Асп103. У Bcl-xL в аналогичной позиции находится остаток глутамата (Глу96), что затрудняет его взаимодействие с Венетоклаксом и служит основой высокой селективности данного соединения [30]. Венетоклакс был исследован в ряде клинических испытаний и в связи с выраженной эффективностью получил одобрение для лечения пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) [6, 37, 38]. Также Венетоклакс (в комбинации с Азацитидином, или Децитабином, или низкими дозами Цитарабина) одобрен для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у пожилых пациентов и пациентов, которым противопоказаны интенсивные режимы химиотерапии. В настоящее время эффективность Венетоклакса активно исследуется для лечения различных опухолевых заболеваний, в особенности гематологических. Необходимо отметить, что описаны и другие селективные антагонисты Bcl-2, например, S55746 [39]. В будущем такие соединения могут пополнить арсенал BH3-миметиков, применяемых в клинической практике, и использоваться, например, в случае возникновения резистентных к Венетоклаксу мутаций в структуре Bcl-2.

Bcl-xL как мишень в терапии. В качестве потенциальных ингибиторов Bcl-xL изучалось большое количество соединений, таких как A-385358, S44563, WEHI-539, A-1331852, A-1155463, Навитоклакс, различные производные Госсипола и другие. Однако, несмотря на данные, демонстрирующие определенную эффективность ингибиторов Bcl-xL в доклинических исследованиях, было проведено лишь небольшое число клинических испытаний с антагонистами этого белка. Опыт применения Навитоклакса наглядно показал ключевые проблемы таргетирования Bcl-xL. Как было сказано выше, основной причиной ограничения использования этого препарата стала выраженная тромбоцитопения, возникающая вследствие ингибирования Bcl-xL в тромбоцитах [40]. Развитие тромбоцитопении также наблюдалось и при использовании в экспериментах на мышах соединения A-1155463, которое обладает пикомолярной аффинностью к Bcl-xL [32]. Именно выраженные побочные эффекты (в частности, тромбоцитопения) и вытекающая из них необходимость ограничения дозы стали наиболее существенными препятствиями в продвижении ингибиторов Bcl-xL в терапевтическую практику [10].

В настоящее время активно исследуются способы решения указанной проблемы [41]. Так, одним из направлений для устранения системных побочных эффектов является таргетная доставка лекарства в опухоль (например, с помощью конъюгации с моноклональным антителом). Конъюгат антитела с лекарственным препаратом ABBV-155, нацеленный на поверхностный маркер B7H3 и несущий антагонист Bcl-xL, недавно вступил в первую фазу клинических испытаний (NCT03595059). Кроме того, проходит набор пациентов с гормон-чувствительным раком предстательной железы и метастазированием в лимфоузлах для клинических испытаний вакцины Bcl-xl_42-CAF09b, содержащей Bcl-xl_42 (пептидный фрагмент белка Bcl-xL) и адъювант CAF09b (NCT03412786). Такие терапевтические подходы могут в будущем стать новой опцией в таргетировании Bcl-xL в опухолевых клетках, что позволит устранить нежелательные побочные эффекты в виде тромбоцитопении.

Проблемы подавления белка Bcl-w. Белок Bcl-w участвует в широком спектре как физиологических, так и патологических процессов, в том числе в развитии опухолевых заболеваний [42]. Следовательно, ингибиторы этого белка могли бы расширить арсенал противоопухолевых препаратов. Однако в настоящее время селективные ингибиторы Bcl-w отсутствуют, а сложность их создания может объясняться конформационной «гибкостью» этого белка [43]. BH3-миметики АВТ-737 и Навитоклакс способны ингибировать Bcl-w наряду с Bcl-2 и Bcl-xL. Однако было показано, что АВТ-737 разрушает в клетках комплексы между Bcl-w и проапоптотическими партнерами менее эффективно, чем аналогичные взаимодействия с белками Bcl-2 и Bcl-xL [36]. Эти данные, вероятно, касаются и Навитоклакса, учитывая его схожесть с АВТ-737. Таким образом, вопрос разработки селективных антагонистов Bcl-w остается открытым.

Перспективы подавления белка Bfl-1. Bfl-1 (Bcl-2A1) является наименее изученным антиапоптотическим белком семейства Bcl-2. Для Bfl-1 не описано BH3-миметиков, в том числе неселективных. Роль данного белка в процессе канцерогенеза также исследована недостаточно, хотя имеющиеся данные показывают потенциальную роль данного белка в обеспечении устойчивости к действию BH3-миметиков [43]. Было показано, что в строении BH3-связывающего кармана белка Bfl-1 присутствует цистеиновый аминокислотный остаток (C55), что отличает данный белок от остальных антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 [44]. Следовательно, в будущем возможно создание специфичных ковалентных высокоаффинных ингибиторов Bfl-1.

Таргетирование белка Mcl-1. Важным структурным отличием Mcl-1 от других антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 является конформационная ригидность его BH3-связывающего кармана, что осложняло создание молекул, эффективно взаимодействующих с данным белком [45]. Как итог, до недавнего времени не было представлено селективных антагонистов Mcl-1. Однако за последние годы был сделан существенный прорыв в этом направлении [46] и был описан ряд BH3-миметиков, направленных на Mcl-1 и обладающих высокой селективностью и аффинностью к мишени, таких как S63845 [33], AZD-5991 [47], AMG-176 [48] и другие [46]. Эти соединения или их производные сейчас находятся в I фазе клинических испытаний среди пациентов с различными гематологическими заболеваниями как в качестве индивидуальных агентов, так и в комбинации с Венетоклаксом.

Также стоит отметить, что уникальной особенностью Mcl-1 среди других белков семейства Bcl-2 является его короткий период полужизни. Это обстоятельство позволяет ингибировать Mcl-1 непрямыми способами за счет понижения его содержания в клетке на различных уровнях регуляции – транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном [12].

ГДЕ: В КАКИХ ОПУХОЛЯХ ЭФФЕКТИВНА ТЕРАПИЯ BH3-МИМЕТИКАМИ?

«Близость» к гибели как необходимое условие эффективности BH3-миметиков. Важным фактором для практического применения того или иного агента в качестве противоопухолевой терапии является его избирательность в отношении опухолевых клеток. Следовательно, для потенциального применения BH3-миметиков в лечении онкологических заболеваний ключевым является вопрос, насколько данные вещества способны вызывать апоптоз в злокачественных клетках, не затрагивая выживание нормальных. Имеющиеся данные указывают на то, что бóльшая часть нормальных клеток не чувствительна к апоптозу, индуцированному BH3-миметиками [11, 49].

Одним из основных объяснений подобного феномена является неодинаковая «близость» к апоптозу различных клеток [49, 50]. Так, нормальные клетки гематологического происхождения находятся в числе наиболее чувствительных к апоптозу, в то время как постмитотические клетки, такие как нейроны и кардиомиоциты, в существенной степени менее склонны к запуску апоптотической программы [51]. Как итог, первые демонстрируют высокую чувствительность к апоптозу, индуцированному BH3-миметиками, тогда как последние относительно устойчивы к данным агентам [49].

Вместе с тем важно понять, какие факторы отвечают за указанную склонность клеток к гибели. Интересным и важным наблюдением в контексте описываемого феномена является более высокая экспрессия белков-регуляторов апоптоза в активно делящихся клетках и снижение уровня данных белков в постмитотических клетках [51]. Первые, при этом, демонстрируют значительно бóльшую чувствительность к апоптотическим стимулам. Отсюда можно сделать предположение, что склонность клетки к апоптозу определяется уровнем экспрессии компонентов, отвечающих за функционирование апоптотической машины [11, 49]. Именно такие клетки и являются наиболее чувствительными к действию различных агентов и стимулов, индуцирующих апоптоз, в том числе BH3-миметиков.

В процессе перерождения злокачественные клетки сталкиваются с большим количеством факторов, которые могут вести к увеличению уровня и активности проапоптотических белков. Так, некоторые онкогены, например *Myc*, ведут к их повышенной экспрессии [51]. Чтобы выжить в подобных условиях, опухолевые клетки могут полагаться на увеличенную экспрессию антиапоптотических белков [52]. При этом отбор происходит в пользу клонов, которые имеют уровень данных белков, достаточный для нейтрализации их контрпартнеров. Проходя через множество «стрессовых испытаний» в процессе своей эволюции, опухолевые клетки, в конечном итоге, приходят к состоянию, в котором большое количество проапоптотических белков компенсируется высоким содержанием антиапоптотических [49, 53]. Верно подобранный

стрессовый стимул может подтолкнуть опухолевую клетку к апоптозу, оказав при этом меньшее влияние на клетки, менее склонные к запуску данной программы гибели. В случае BH3-миметиков их действие приведет к высвобождению большого числа проапоптотических факторов и запуску гибели в тех клетках, которые находятся в состоянии «близости» к апоптозу. Вместе с тем, склонные к апоптозу нормальные клетки, для которых подобный стимул окажется настолько же существенным, также вступят в процесс гибели, что обусловит токсичность терапии [11, 49].

«Анти-апоптотическая зависимость» клеток. Указанное условие «близости» опухолевых клеток к гибели является необходимым, но недостаточным для эффективного действия индивидуальных BH3-миметиков. Ключевую роль в определении чувствительности этих клеток к данным препаратам играет их различная зависимость от того или иного белка семейства Bcl-2 для своего выживания [50, 53, 54]. В случае, когда опухолевые клетки преимущественно полагаются на один белок для выживания, ингибирование этого белка может эффективно индуцировать апоптоз [53]. Впрочем, гибели будут подвержены и те нормальные клетки, которые полагаются на тот же белок семейства Bcl-2. В случае же, когда опухолевые клетки полагаются на несколько антиапоптотических белков семейства Bcl-2, необходимо использование комбинации BH3-миметиков, что, однако, будет повышать вероятность возникновения нежелательных эффектов.

Именно зависимость клеток различных опухолей от того или иного белка формирует их чувствительность к BH3-миметикам и определяет потенциал терапии [37, 38, 53]. Зависимость же нормальных клеток от тех же белков, напротив, является фактором, ограничивающим применение BH3-миметиков. Как было отмечено выше, ярким примером побочных реакций, наблюдаемых при действии BH3-миметиков, является возникновение тромбоцитопении при применении Навитоклакса [5, 40].

Вероятно, в основе формирования зависимости от одного белка лежит не столько повышенный уровень его экспрессии, сколько отсутствие компенсаторного воздействия со стороны других представителей семейства Bcl-2. Так, в ряде работ показана значимость Mcl-1 для приобретения устойчивости клеток к действию Навитоклакса и Венетоклакса [29]. Напротив, эффективность ингибирования Mcl-1 обратно коррелирует с уровнем мРНК Bcl-xL [33]. Более того, в клинических испытаниях Венетоклакса соотношение уровней мРНК Bcl-2/Bcl-xL и Bcl-2/Mcl-1 в большей степени коррелировало с эффективностью, чем уровень только мРНК Bcl-2 [55].

Важным шагом в изучении зависимостей разных типов опухолей от отдельных антиапоптотических белков семейства Bcl-2 послужило использование BH3-профайлинга [50]. Данный метод основан на количественной оценке ПВММ после добавления BH3-пептидов к клеткам опухолевых тканей пациентов с различными онкологическими заболеваниями. Использование BH3-пептидов, селективно взаимодействующих с отдельными белками, позволяет выяснить, насколько тот или иной антиапоптотический представитель отвечает за выживание опухолевых клеток. Так, если добавление BH3-пептида белка Noxa, селективно взаимодействующего с Mcl-1, приведет к существенному выходу цитохрома *c* из митохондрий, можно сделать вывод о зависимости клеток от Mcl-1 и, следовательно, потенциальной эффективности ингибирования этого белка [49]. Кроме того, BH3-профайлинг позволяет оценить степень «прайминга» опухолевых клеток (т.е. предварительной «готовности») к запуску апоптоза. Состояние «высокого прайминга» означает, что нейтрализация небольшого количества антиапоптотических белков приведет к эффективному высвобождению проапоптотических белков и индукции апоптоза. Напротив, «низкий прайминг» требует ингибирования большого количества антиапоптотических белков для индукции апоптоза. В будущем метод BH3-профайлинга может стать важным инструментом для предсказания ответа пациентов на BH3-миметики и перехода к персонализированной медицине, что позволит подбирать терапию не только для конкретных типов опухолей, но и для отдельных пациентов [49].

Спектр действия BH3-миметиков. Хотя высокая чувствительность к BH3-миметикам была показана для клеточных линий ряда карцином [34], опухоли гематологического происхождения демонстрируют существенно более высокий уровень ответа на BH3-миметики. И хотя данных относительно селективных антагонистов Bcl-xL существенно меньше, чтобы можно было сделать вывод об их эффективности на большой выборке клеточных линий, более высокая эффективность BH3-миметиков к Bcl-2 и Mcl-1 в клетках гематологических опухолей не вызывает сомнений [48, 49]. Это отражается в том числе и в выборе направлений клинических исследований данных препаратов. Так, на сегодняшний день III фаза клинических испытаний для Венетоклакса инициирована только для пациентов с опухолями гематологического происхождения.

BH3-миметики к Mcl-1, недавно вступившие в фазу клинических испытаний, также тестируются исключительно среди пациентов с гематологическими опухолями.

Как сказано выше, в основе подобного феномена, вероятно, лежит как бóльшая «близость» клеток гематологических опухолей к апоптозу, так и бóльшая частота их зависимости от одного антиапоптотического белка для выживания [49]. Тем не менее имеющиеся данные показывают, что даже среди гематологических опухолей действие BH3-миметиков имеет ограниченную эффективность [56]. В настоящее время единственным известным исключением является ХЛЛ, для которого показана строгая зависимость от Bcl-2 [53], а также выраженный ответ пациентов с данным заболеванием [37,38]. Неудивительно, что Венетоклакс впервые получил одобрение к медицинскому применению именно для данной болезни [6].

Также Венетоклакс в комбинации с химиотерапевтическими препаратами одобрен для лечения ОМЛ, клетки которого демонстрируют преимущественную, но не абсолютную зависимость от Bcl-2 [54]. Вместе с тем, встречаются случаи зависимости от Mcl-1, а ряд исследований показывает не только значимость Mcl-1 для клеток данного типа опухоли, но и синергизм ингибирования Mcl-1 и Bcl-2 в них [57]. Следовательно, по крайней мере в некоторых случаях клетки ОМЛ полагаются одновременно на Mcl-1 и Bcl-2 для выживания, и подавление одного белка может быть неэффективно. Как итог, требуется комбинация BH3-миметиков. Отметим, клинические испытания комбинации BH3-миметиков к Mcl-1 и Венетоклакса были инициированы именно для пациентов с ОМЛ.

Как и для ОМЛ (и в отличие от ХЛЛ), для ряда других гематологических опухолей не было выявлено строгой зависимости от одного антиапоптотического белка семейства Bcl-2 [49]. Клинические испытания Венетоклакса продемонстрировали его различную эффективность на пациентах с разными формами неходжкинских лимфом. Так, объективный уровень ответа при лечении пациентов с релапсирующими/рефрактерными диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой, фолликулярной лимфомой и мантийноклеточной лимфомой составил 18%, 38% и 75% соответственно [56]. Вместе с тем, комбинация Венетоклакса с Ритуксимабом и Бендамустином не показала существенного преимущества при лечении пациентов с релапсирующей/рефрактерной фолликулярной лимфомой в сравнении с действием только Ритуксимаба и Бендамустина [58]. Венетоклакс в комбинации с Бортезомибом и Дексаметазоном показал высокий объективный уровень ответа (67%) при лечении пациентов с релапсирующей/рефрактерной множественной миеломой (ММ) [59]. Как итог, были инициированы клинические испытания III фазы для лечения пациентов с некоторыми из указанных заболеваний. Результаты данных исследований могут расширить область применения Венетоклакса.

Результаты клинических испытаний BH3-миметиков к Mcl-1 на сегодняшний день большей частью недоступны. На большой выборке клеточных линий (952 линии) ингибитор Mcl-1 продемонстрировал эффективность преимущественно среди клеток гематологических опухолей, в особенности ММ и ОМЛ [48]. Вместе с тем, ввиду отсутствия строгой зависимости от Mcl-1 клеток ММ и ОМЛ [54,60], как и клеток других гематологических опухолей, маловероятно, что ингибиторы Mcl-1 продемонстрируют исключительную эффективность у пациентов с данными заболеваниями. Имеющиеся промежуточные результаты тестирования ингибитора Mcl-1 AMG-176 среди пациентов с релапсирующей/рефрактерной ММ подтверждают данное предположение: большинство пациентов (22/26) прекращали лечение из-за прогрессии заболевания [61]. Таким образом, на сегодняшний день BH3-миметики имеют ограниченное применение, и огромный потенциал, которым обладает данный класс препаратов, вероятно, остается не раскрытым. Дальнейшие исследования должны привести к решению указанной проблемы.

КОГДА: КАК РАСШИРИТЬ ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ BH3-МИМЕТИКОВ?

Строгая зависимость от Bcl-2, которую демонстрируют клетки ХЛЛ, закономерно отражается в высокой эффективности Венетоклакса при лечении пациентов с данным заболеванием. Для других злокачественных опухолей может наблюдаться зависимость от разных белков, отличающихся от пациента к пациенту. В этом случае нацеленное действие на белок, который определяет выживание клеток опухоли, может привести в выраженному ответу. Стало быть, необходимо детальное изучение механизмов, которые лежат в основе формирования зависимости от каждого из этих белков, а также молекулярных маркеров, позволяющих выявить подобные случаи. Следовательно, одним из ключевых направлений в области применения BH3-миметиков является поиск предиктивных биомаркеров, то есть молекулярно-генетических характе-

ристик пациента, которые могут предсказать ответ на терапию. Также важную роль в развитии использования BH3-миметиков играет исследование механизмов, которые лежат в основе формирования резистентности к BH3-миметикам, а также способов ее преодоления. Наконец, важным аспектом является изучение рациональных комбинаций BH3-миметиков друг с другом либо с другими препаратами. Данные комбинации могут вести к преодолению устойчивости к индивидуальным BH3-миметикам, а также демонстрировать более высокую эффективность в элиминировании опухолевых клеток. Действие комбинаций BH3-миметиков друг с другом может быть особенно эффективно в случае зависимости опухолей одновременно от нескольких антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Изучение указанных аспектов – биомаркеров эффективности, факторов устойчивости и комбинаторных подходов – позволит существенно расширить область применения BH3-миметиков, в том числе, вероятно, на пациентов с солидными опухолями.

Предиктивные биомаркеры для использования BH3-миметиков. Как указано выше, одним из потенциальных предикторов эффективности Венетоклакса является оценка зависимости опухолевых клеток от Bcl-2 с помощью метода BH3-профайлинга [50]. Для проведения этого метода необходимо получить материал от пациентов, в котором присутствуют опухолевые клетки, например, аспират костного мозга [62]. Вместе с тем, в подобных образцах процент опухолевых клеток может быть относительно невысоким. Следовательно, необходимо отделять ответ опухолевых клеток от ответа нормальных. С этой целью может быть использован метод проточной цитофлуориметрии с прокраской поверхностных маркеров опухолевых клеток антителами. Далее измеряют эффективность ПВММ, вызванной BH3-пептидами, обладающими различной избирательностью в отношении отдельных антиапоптотических белков [50,54]. В случае, когда ПВММ происходит эффективно в результате нейтрализации Bcl-2, можно ожидать высокий уровень ответа на Венетоклакс. Логично предположить, что метод BH3-профайлинга может быть применим и для предсказания эффективности BH3-миметиков к другим антиапоптотическим белкам семейства Bcl-2.

Метод BH3-профайлинга показывает высокую предиктивную способность в случае анализа ответа клеточных линий [54,60]. Также данный метод показал корреляцию с ответом на Венетоклакс пациентов с ОМЛ [62]. Вместе с тем, пока неизвестно, какова будет эффективность данного метода в условиях реальной клинической практики для предсказания ответа пациентов на этот препарат и, в будущем, на другие BH3-миметики. Необходимы проспективные клинические исследования, чтобы оценить применимость метода BH3-профайлинга для стратификации пациентов. Более того, определенные сложности могут возникнуть и с техническим применением метода. Так, в упомянутом испытании Венетоклакса для лечения пациентов с ОМЛ только для 12 из 18 пациентов образцы соответствовали установленным в исследовании критериям (более чем 50% выживаемость клеток после разморозки образцов и более чем 5% содержание бластов ОМЛ в образце) [62].

Другим способом определения зависимости опухолевых клеток от антиапоптотических белков семейства Bcl-2 может быть оценка уровня различных представителей данного семейства. Высокий уровень экспрессии мишени и низкий уровень антиапоптотических белков семейства Bcl-2, которые не являются мишенью для того или иного BH3-миметика, вполне закономерно может быть предиктором ответа на данный BH3-миметик. Так, ответ клеточных линий неходжкинских лимфом и мелкоклеточного рака легкого на Венетоклакс коррелирует с уровнем экспрессии Bcl-2 [30,63]. Для клеточных линий ММ ответ на этот препарат определяется соотношением мРНК Bcl-2/Bcl-xL и Bcl-2/Mcl-1 [64]. Аналогичным образом данные соотношения коррелировали и с ответом пациентов с ММ, при этом уровень корреляции снижался в ряду Bcl-2/Bcl-xL -> Bcl-xL -> Bcl-2/Mcl-1 -> Bcl-2 -> Mcl-1 [55]. Для пациентов с ОМЛ показана зависимость ответа на Венетоклакс от процента клеток, экспрессирующих Bcl-2 и не экспрессирующих Bcl-xL [62]. Для ингибитора Mcl-1 S63845 эффективность в клеточных линиях ОМЛ не коррелировала с уровнем мРНК мишени, но демонстрировала обратную зависимость от содержания мРНК Bcl-xL [33]. Аналогичные данные были получены и на широкой выборке клеточных линий для BH3-миметика к Mcl-1 AMG-176 [48]. Также высокая эффективность S63845 показана на клеточных линиях мелкоклеточного рака легкого с высоким содержанием Mcl-1 и низким содержанием Bcl-xL [65].

Содержание проапоптотических белков также может быть биомаркером ответа на BH3-миметики. Например, для ингибиторов Mcl-1 показана роль порообразующего белка Bak в качестве предиктора ответа [48]. Вместе с тем, данные относительно роли проапоптотических белков в предсказании ответа на BH3-миметики скорее остаются спорными. Так, в доклинических исследованиях был показан Bim-зависимый механизм действия Венетоклакса [66], а на кле-

точных линиях диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы белковый уровень Bim (равно как Bcl-2 и Bak) прямо коррелировал с ответом на Венетоклакс [67]. Кроме того, более низкое соотношение белков Bcl-2/Bim отражалось в повышенной чувствительности к этому препарату на клетках фолликулярной лимфомы [68]. Все эти данные свидетельствуют в пользу того, что уровень Bim должен прямо коррелировать с ответом на Венетоклакс. Однако в одном из испытаний на пациентах с ОМЛ, напротив, была показана обратная корреляция уровня мРНК Bim с ответом на данный BH3-миметик [69].

Таким образом, уровень экспрессии (либо соотношение уровней экспрессии) различных членов семейства Bcl-2 может быть полезным биомаркером в предсказании ответа на BH3-миметики. В то же время необходимо определить наилучшие соотношения для каждого конкретного заболевания. Также важно определить и наиболее подходящие методы детекции в каждом конкретном случае, так как определение экспрессии на уровне мРНК, хотя и обладает относительной простотой, может в существенной степени не отражать уровень белка в клетке. В особенности это справедливо для белков, чей уровень сильно зависит от посттрансляционных модификаций, например, для Bim и Mcl-1.

Некоторые генетические аберрации также коррелируют с зависимостью опухолей от индивидуальных белков семейства Bcl-2. Так, ярким примером является транслокация t(11;14) в клетках ММ, которая встречается примерно у 20% пациентов [70]. В *in vitro* экспериментах показано, что Венетоклакс специфически эффективен в отношении клеточных линий с указанной транслокацией, при этом она коррелирует с высоким соотношением мРНК Bcl-2/Mcl-1 [71]. Как итог, при использовании Венетоклакса в качестве монотерапии для лечения пациентов с ММ ответ наблюдается преимущество в случае наличия транслокации t(11;14) [55]. Другим примером формирования зависимости от Bcl-2 являются мутации в генах изоцитратдегидрогеназ, *IDH1* и *IDH2*, в клетках ОМЛ [72].

Механизмы возникновения резистентности к BH3-миметикам. Одной из главных проблем в лечении опухолевых заболеваний является возникновение резистентности к терапии. Очевидно, данная проблема касается и применения BH3-миметиков (рис. 2). Так, описаны случаи возникновения устойчивости к Венетоклаксу у пациентов с ХЛЛ [73].

В основе формирования приобретенной резистентности к BH3-миметикам нередко лежат те же механизмы, которые могут быть ответственны за исходную устойчивость к ним, а именно, нарушения регуляции анти- и проапоптотических представителей семейства Bcl-2. Так, повышение уровня антиапоптотических белков (не являющихся мишенью используемого препарата) в опухолевых клетках с приобретенной устойчивостью к Венетоклаксу показано в ряде работ *in vitro* [74]. Аналогичные данные имеются и для других BH3-миметиков, например, ABT-737 [75]. При этом в основе упомянутых механизмов нарушения регуляции белков семейства Bcl-2 может лежать действие различных сигнальных каскадов, часто подверженных активации в опухолевых клетках, таких как MEK/ERK [76] и PI3K/AKT/mTOR [77]. Приобретенная устойчивость к действию BH3-миметиков также может сопровождаться снижением уровня проапоптотических белков, например, Bax и Bim [68, 74]. Снижение функциональной активности проапоптотических белков, например, точечная мутация G179E в Bax, вело к нарушению транслокации данного белка из цитоплазмы к внешней митохондриальной мембране [78]. Изучение механизмов возникновения устойчивости к действию BH3-миметиков имеет большое значение для подбора рациональных терапий. Так, при активации различных внутриклеточных каскадов использование ингибиторов соответствующих сигнальных путей может быть эффективно для преодоления резистентности к BH3-миметикам. Вместе с тем, в случае возникновения мутаций в порообразующих белках опухолевые клетки могут приобретать рефрактерность к апоптозу, что приведет к нерациональности использования этих агентов.

Отдельного упоминания в контексте устойчивости к BH3-миметикам заслуживают «резистентные мутации» – изменения в структуре белка, которые ведут к снижению эффективности препарата, нацеленного на данную мишень. Резистентные мутации известны для большого числа препаратов, например, для ингибиторов рецепторов с тирозинкиназной активностью. Вместе с тем появляются данные о том, что резистентные мутации могут обуславливать устойчивость к действию Венетоклакса. Так, мутация G101V была обнаружена у 7 из 15 пациентов с ХЛЛ, у которых наблюдалась прогрессия на фоне применения этого препарата [79]. Наличие данной аминокислотной замены в белке ведет к снижению аффинности Венетоклакса к Bcl-2 примерно в 180 раз [79]. Недавно были опубликованы обновленные результаты данного исследования на более широкой выборке пациентов. Как итог, мутация G101V была обнаружена еще у 4 пациентов вдобавок к 7 ранее описанным случаям. При этом в 10 из 11 таких случаев в

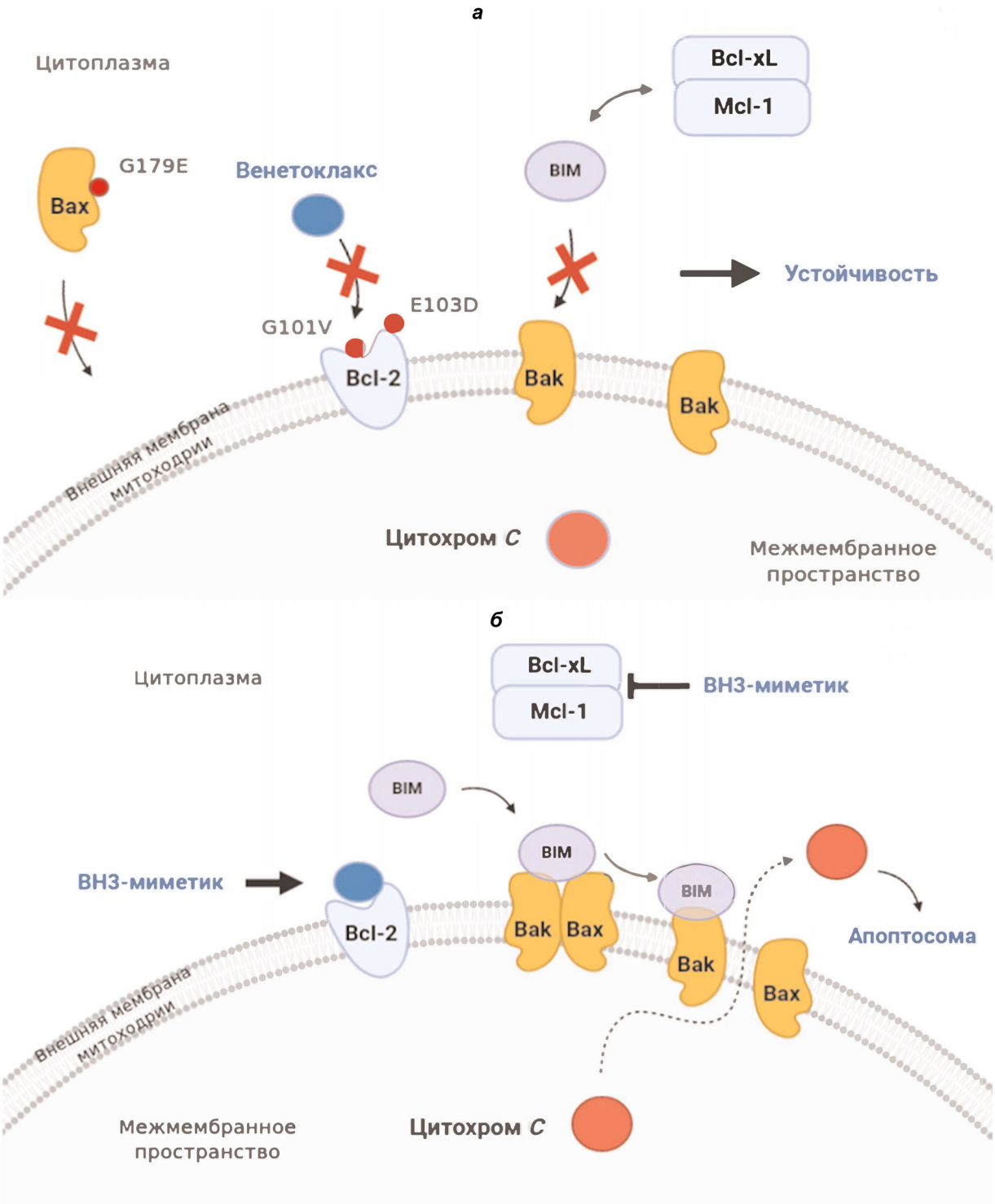


Рис. 2. *а* – Механизмы возникновения резистентности к BH3-миметикам (на примере Венетоклакса) включают появление точечных мутаций в мишени – белке Bcl-2 (например, G101V и E103D), нарушения в работе проапоптотических белков (например, за счет точечной мутации G179E в Bax), а также повышенную экспрессию антиапоптотических белков Bcl-xL и Mcl-1; *б* – предполагаемый механизм преодоления резистентности с помощью комбинаций различных BH3-миметиков

белке Bcl-2 были выявлены и другие мутации, а медианное значение мутаций для этих пациентов равнялось трем [73]. Примечательно, одной из обнаруженных аминокислотных замен была E103D (в описываемом исследовании выявлена у 4 пациентов) [73]. Как отмечено ранее, именно наличие аспартата в позиции 103 обуславливает избирательность Венетоклакса в отноше-

нии Bcl-2 в сравнении с Bcl-xL, у которого в альтернативной позиции (96) находится глутамат [30]. Следовательно, замена E103D закономерно должна вести к снижению эффективности этого BH3-миметика. Что касается замены G101V, она также была описана другой группой исследователей у 3 из 4 пациентов, которые приобрели резистентность к Венетоклаксу [80]. Помимо мутаций, обнаруженных в указанных выше исследованиях [73,79,80], кандидатом на роль резистентной для Венетоклакса мутации является замена F104L [74]. Замены альтернативной аминокислоты в структуре мышиного Bcl-2 (F101C и F101L) ухудшали связывание Bcl-2 с этим препаратом [78].

Важно отметить, что частота встречаемости аллелей с мутациями в структуре Bcl-2 существенно варьировала среди пациентов (так, для аллелей G101V от 0,1 до 68,4%) [73]. Также показано, что различные клоны опухолевых клеток, полученные от одного пациента, либо характеризовались повышенным уровнем Bcl-xL, либо имели мутацию Bcl-2 G101V [79]. Таким образом, резистентность к Венетоклаксу может иметь комплексный характер для отдельных пациентов. В подобных случаях необходимо учитывать все механизмы возникновения устойчивости к BH3-миметикам для каждого индивидуального больного. Что касается возможных способов преодоления устойчивости к Венетоклаксу клеток с резистентными формами белка, в дальнейшем могут быть разработаны новые BH3-миметики к Bcl-2, чье взаимодействие с мишенью не будет нарушаться указанными аминокислотными заменами. Подобный подход был успешно применен для преодоления устойчивости клеток к ингибиторам различных мишеней, например, EGFR и BCR-ABL.

Перспективные комбинации BH3-миметиков. Использование комбинаций различных терапий обладает рядом преимуществ в сравнении с действием индивидуальных препаратов. Во-первых, ингибирование одного белка/пути передачи сигнала может быть неэффективно ввиду наличия компенсаторной активности со стороны других белков/сигнальных путей, тогда как действие на оба звена приведет к выраженному ответу. Во-вторых, даже при высокой эффективности монотерапии в популяции опухолевых клеток могут быть отдельные клоны, в которых блокирование одного белка/сигнального пути будет недостаточно для индукции апоптоза. Как итог, подобные клоны могут быть ответственны за возникновение рецидива у пациентов, при этом использованная ранее терапия будет неэффективна для потомков исходно резистентных клонов.

Одним из возможных направлений в поиске рациональных комбинаций BH3-миметиков является комбинирование нескольких препаратов данного класса. Как отмечалось выше, в ряде работ показан выраженный синергизм при использовании двух BH3-миметиков, в то время как использование их по отдельности было существенно менее успешно [57,81–84]. Так, была показана эффективность одновременного ингибирования Bcl-2 и Mcl-1 [57,81], Bcl-2 и Bcl-xL [83], Mcl-1 и Bcl-xL [84]. Очевидно, в указанных случаях клетки демонстрируют зависимость сразу от двух белков семейства Bcl-2. Вместе с тем, важной является возможность практического применения комбинаций различных BH3-миметиков. В случае использования ингибиторов Bcl-2 и Mcl-1 в экспериментах *in vivo* показано, что подобная комбинация обладает умеренной токсичностью, не влияя существенно на гемопоэз [57,81]. В настоящее время комбинации Венетоклакса и различных BH3-миметиков к Mcl-1 оцениваются на первой стадии клинических испытаний для лечения пациентов с ОМЛ. Опыт одновременного ингибирования Bcl-2 и Bcl-xL в существенной степени может быть оценен на примере использования Навитоклакса, в том числе и в ряде клинических испытаний [5,10]. Как отмечено выше, выраженная тромбоцитопения оказалась дозолимитирующим фактором для применения Навитоклакса. В то же время данный побочный эффект связан с ингибированием Bcl-xL, тогда как не было выявлено существенных побочных эффектов, ассоциированных специфически с одновременным подавлением Bcl-2 и Bcl-xL. Следовательно, есть надежда на потенциальное применение комбинации BH3-миметиков к Bcl-2 и Bcl-xL. Что касается одновременного использования ингибиторов Mcl-1 и Bcl-xL, подобная комбинация, вероятно, будет обладать существенной токсичностью. Помимо важной роли Bcl-xL в выживании тромбоцитов, показана значимость Mcl-1 и Bcl-xL для подавления апоптоза в мегакариоцитах – предшественниках тромбоцитов [85]. Следовательно, блокирование данных белков может в существенной степени обострять тромбоцитопению, возникающую при подавлении Bcl-xL.

Также большим потенциалом обладают комбинации BH3-миметиков с различными препаратами нацеленного действия или с химиотерапевтическими агентами. Данные доклинических исследований о синергизме действия BH3-миметиков с такими препаратами, о молекулярных механизмах, лежащих в его основе, а также о клинических испытаниях указанных комбинаций суммированы в таблице.

Перспективные комбинации BH3-миметиков с другими противоопухолевыми препаратами

Комбинация	Экспериментальная модель	Возможный механизм синергизма	Примеры клинических исследований	Ссылки
BH3-миметики к Bcl-2				
Навитоклакс + Ритуксимаб	выраженный эффект комбинации на клеточной линии DoHH2 (B-клеточная лимфома) в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	одним из эффектов Ритуксимаба является ингибирование активности NF-kB, что ведет к уменьшению экспрессии Bcl-xL	фаза II, Ритуксимаб + + Навитоклакс; пациенты с ХЛЛ (NCT01087151), исследование завершено	[35]
Навитоклакс + Эрлотиниб (ингибитор EGFR)	выраженный эффект комбинации на клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)	действие Эрлотиниба приводит к понижению уровня экспрессии Mcl-1, а также к увеличению уровня Bim	фаза I, Эрлотиниб + Навитоклакс; пациенты с солидными опухолями (NCT01009073), исследование завершено	[86]
Навитоклакс + Доцетаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинации на клеточной линии аденокарциномы яичника SKOV3 *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)	снижение уровня белка Mcl-1 при действии Доцетаксела	фаза I, Доцетаксел + Навитоклакс; пациенты с солидными опухолями (NCT00888108), исследование завершено	[86]
Навитоклакс + Траметиниб (ингибитор MEK)	повышенная эффективность комбинации на клеточных линиях разных тканей мутантных по гену *KRAS* в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)	Траметиниб приводит к увеличению уровня Bim	фаза I/II, Траметиниб + + Навитоклакс; пациенты с солидными опухолями (NCT02079740), исследование активно	[87]
Венетоклакс + Селинексор	повышенная эффективность комбинации на клеточной линии ОМЛ THP-1 в экспериментах *in vitro*	Селинексор ингибирует экспортин 1 (XPO1), что приводит к уменьшению уровня Mcl-1	фаза I, Селинексор + + Венетоклакс; пациенты с рецидивирующими гематологическими заболеваниями (NCT03955783), исследование активно	[88]
Венетоклакс + Воруциклиб (ингибитор CDK9)	выраженный эффект комбинации на линиях ОМЛ MV4-11, THP-1 в экспериментах *in vitro* и клетках MV4-11 *in vivo* (ксенографты)	действие ингибиторов CDK9 (Воруциклиба или AZD4573) ведет к уменьшению содержания Mcl-1 за счет негативной регуляции на транскрипционном уровне	фаза I, CYC065 (ингибитор CDK 2/9) + Венетоклакс; пациенты с ХЛЛ (NCT03739554) и ОМЛ (NCT04017546), исследования активны	[89]
Венетоклакс + AZD4573 (ингибитор CDK9)	выраженный эффект комбинации на линиях SU-DHL-4 и OCI-AML3 в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)			[90]
Венетоклакс + Дувелисиб (ингибитор PI3K-δ и PI3K-γ)	выраженный эффект комбинации на *ex vivo* клеточных образцах, взятых у пациентов с ХЛЛ	действие Дувелисиба ведет к увеличению экспрессии белка Bcl-2 и BH3-only белков в клетках ХЛЛ, что может быть опосредовано ингибированием PI3K-δ и PI3K-γ	фаза II, Дувелисиб + Венетоклакс; пациенты с ХЛЛ (NCT03534323), исследование активно	[91]
Венетоклакс + Дексаметазон/ Карфилзомиб (ингибитор протеасом)	повышенная эффективность комбинации Венетоклакс + Дексаметазон/Карфилзомиб на линии мантийноклеточной лимфомы KMS18 в экспериментах *in vitro*. Повышение чувствительности к Венетоклаксу при сочетании с Дексаметазоном в *ex vivo* образцах пациентов с ММ	Карфилзомиб ведет к подавлению Mcl-1 предположительно за счет увеличения экспрессии BH3-only белка Noxa – негативного регулятора Mcl-1. Действие Дексаметазона ведет к увеличению уровня Bim	фаза II, Дексаметазон/ Карфилзомиб + Венетоклакс; пациенты с мантийноклеточной лимфомой (NCT02899052), исследование активно	[92]

Продолжение таблицы

Комбинация	Экспериментальная модель	Возможный механизм синергизма	Примеры клинических исследований	Ссылки
Венетоклакс + Идарубицин/ Цитарабин	выраженный эффект комбинаций на клеточных линиях ОМЛ в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)	высокие дозы Идарубицина снижают уровень экспрессии Mcl-1	фаза I, Идарубицин/ Цитарабин + Венетоклакс; пациенты с ОМЛ (NCT03194932), исследование активно	[93]
Венетоклакс + Квизартиниб (ингибитор FLT3)	выраженный эффект комбинации на линиях мантийноклеточной лимфомы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)	действие Квизартиниба приводит к снижению уровня Mcl-1 и Bcl-xL за счет ингибирования рецептора FLT3-ITD	фаза I/II, Квизартиниб + + Венетоклакс; пациенты с ОМЛ с мутацией FLT3/ ITD (NCT03735875), исследование активно	[94]
Венетоклакс + Эназидениб (ингибитор мутантной IDH2)	выраженный эффект комбинации на *ex vivo* клеточных образцах, взятых у пациентов с ОМЛ, а также в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	действие Эназидениба приводит к уменьшению уровня Bcl-2 за счет ингибирования мутантной формы IDH2	фаза I/II, Эназидениб + + Венетоклакс; пациенты с ОМЛ (NCT04092179), исследование активно	[95]
BH3-миметики к Mcl-1				
AZD-5991 + Бортезомиб (ингибитор протеасом)	выраженный эффект комбинации на клеточной линии ММ NCI-H929 в экспериментах *in vitro и in vivo* (ксенографты)	действие Бортезомиба приводило к увеличению уровня Bim, вероятно, за счет блокирования деградации этого белка в протеасомах	–	[47]
AZD-5991 + CHOP режим	выраженный эффект комбинации на моделях Т-клеточных лимфом в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	механизм не изучен	–	[96]
AMG-176 + Траметиниб (ингибитор MEK)	выраженный эффект комбинации на KRAS-мутантных клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого *in vivo* (ксенографты)	действие Траметиниба приводило к повышению экспрессии белка Bim	–	[97]
AMG-176 + Карфилзомиб (ингибитор протеасом)	выраженный эффект комбинации на ортотопической модели ММ в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	механизм не изучен (вероятно, аналогичен действию Бортезомиба)	фаза I, AMG-176 + Карфилзомиб + Дексаметазон; пациенты с ММ (NCT02675452), испытание активно	[48]
S63845 + Доцетаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинации на клеточную линию рака молочной железы SK-BR-3 в экспериментах *in vitro* и тройном негативном раке молочной железы в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	механизм не изучен	–	[98]
S63845 + Трастузумаб (моноклональное антитело к HER2) или Лапатиниб (ингибитор рецепторных тирозинкиназ)	выраженный эффект комбинаций на клеточную линию рака молочной железы SK-BR-3 в экспериментах *in vitro* и на моделях HER 2-позитивного рака молочной железы в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	механизм не изучен для Трастузумаба; Лапатиниб способствует увеличению экспрессии белка Bim, предположительно, за счет уменьшения активации сигнальных каскадов AKT и ERK, препятствуя тем самым фосфорилированию Bim и его деградации	–	[98]

Окончание таблицы

Комбинация	Экспериментальная модель	Возможный механизм синергизма	Примеры клинических исследований	Ссылки
BH3-миметики к Bcl-xL				
A-1155463 + Доцетаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинаций на различных моделях немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака молочной железы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (ксенографты)	механизм не изучен	–	[99]
A-385358 + Паклитаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинации на клеточные линии немелкоклеточного рака легкого A549 и LX-1 в экспериментах *in vivo* (ксенографты)	механизм не изучен	–	[100]

Отдельно стоит упомянуть и показанную в клинических испытаниях эффективность комбинаций Венетоклакса с другими препаратами. Так, комбинация этого BH3-миметика с гипометилирующими агентами, Азацитидином и Децитабином, показала высокую эффективность при лечении пожилых пациентов с ОМЛ: объективный уровень ответа 68% и медианное значение выживаемости 17,5 мес., что существенно выше аналогичных показателей для монотерапии гипометилирующими агентами [101]. Синергизм действия данной комбинации может быть связан с тем, что гипометилирующие вещества вызывают транскрипционную индукцию Noxa – BH3-only белка, специфически взаимодействующего с Mcl-1. Примечательно, индукция Noxa была связана с не зависящим от эпигенетической регуляции механизмом действия Азацитидина [102]. В другом исследовании показано, что действие комбинации Азацитидина и Венетоклакса подавляет окислительное фосфорилирование в лейкемических стволовых клетках [103]. Также стоит отметить успех использования комбинации Венетоклакса с ингибитором BTK Ибрутинибом, который был продемонстрирован при лечении пациентов с плохим прогнозом с ХЛЛ [104] и мантийноклеточной лимфомой [105]. Данная комбинация оценивается в ряде клинических испытаний III фазы для лечения пациентов с указанными заболеваниями. В доклинических исследованиях установлено, что одним из механизмов усиления проапоптотической активности Венетоклакса при действии Ибрутиниба может быть снижение уровня антиапоптотических белков Bcl-xL и Mcl-1 [106]. Детальное изучение механизмов, лежащих в основе синергизма BH3-миметиков с другими препаратами, в особенности в случае эффективности подобных комбинаций для лечения пациентов, может дать ответы на вопрос о расширении области применения BH3-миметиков и снижении вероятности возникновения к ним резистентности.

Выводы. Белки семейства Bcl-2 играют важную роль в контроле запуска апоптоза, а потому опухолевые клетки нередко характеризуются нарушениями в их работе. Тщательное изучение механизмов функционирования этих белков привело к созданию BH3-миметиков – ингибиторов антиапоптотических белков указанного семейства. Одобрение для медицинского применения Венетоклакса, селективного ингибитора Bcl-2, стало важным достижением в области изучения BH3-миметиков. Вместе с тем, пока спектр применения этого препарата остается относительно узким, а BH3-миметики к другим мишеням в лучшем случае только вступают в фазу клинических испытаний. Дальнейшие исследования, безусловно, должны привести к существенному расширению области применения BH3-миметиков. Этому должно способствовать изучение предикторов чувствительности к ним, в частности, исследование факторов, отвечающих за формирование зависимости опухолевых клеток от того или иного белка семейства Bcl-2. Не должно остаться в стороне и изучение факторов возникновения устойчивости к BH3-миметикам, а данные о возникновении к ним резистентных мутаций указывают на необходимость разработки новых соединений этого класса. Наконец, пристальное внимание необходимо уделить и поиску наиболее эффективных комбинаций BH3-миметиков как друг с другом, так и с препаратами других классов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект 17-75-20102). Работа в лабораториях авторов также поддержана грантами РФФИ (20-015-00500), Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) онкологическими фондами.

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

1. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., and MacFarlane, M. (2012) The “complexities” of life and death: death receptor signalling platforms, *Exp. Cell Res.*, **318**, 1269-1277, doi: 10.1016/j.yexcr.2012.04.005.
3. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J. M. (2013) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 49-63, doi: 10.1038/nrm3722.
4. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2019) Molecular comprehension of Mcl-1: from gene structure to cancer therapy, *Trends Cell Biol.*, **29**, 549-562, doi: 10.1016/j.tcb.2019.03.004.
5. Wilson, W. H., O’Connor, O. A., Czuczman, M. S., LaCasce, A. S., Gerecitano, J. F., et al. (2010) Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity, *Lancet Oncol.*, **11**, 1149-1159, doi: 10.1016/S1470-2045(10)70261-8.
6. Deeks, E. D. (2016) Venetoclax: first global approval, *Drugs*, **76**, 979-987, doi: 10.1007/s40265-016-0596-x.
7. Westphal, D., Kluck, R. M., and Dewson, G. (2014) Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis, *Cell Death Differ.*, **21**, 196-205, doi: 10.1038/cdd.2013.139.
8. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2005) BH3 Domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol. Cell*, **17**, 525-535, doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.003.
9. Czabotar, P. E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., et al. (2013) Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis, *Cell*, **152**, 519-531, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.031.
10. Cory, S., Roberts, A. W., Colman, P. M., and Adams, J. M. (2016) Targeting BCL-2-like proteins to kill cancer cells, *Trends Cancer*, **2**, 443-460, doi: 10.1016/j.trecan.2016.07.001.
11. Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 175-193, doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
12. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Gorbunova, A. S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation, *Cell Death Differ.*, **27**, 405-419, doi: 10.1038/s41418-019-0486-3.
13. Richter-Larrea, J. A., Robles, E. F., Fresquet, V., Beltran, E., Rullan, A. J., Agirre, X., Calasanz, M. J., Panizo, C., Richter, J. A., Hernandez, J. M., Roman-Gomez, J., Prosper, F., and Martinez-Climent, J. A. (2010) Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma, *Blood*, **116**, 2531-2542, doi: 10.1182/blood-2010-02-268003.
14. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005) Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene *BIM*, *Oncogene*, **24**, 1348-1358, doi: 10.1038/sj.onc.1208300.
15. Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M. (1997) Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science*, **275**, 967-969, doi: 10.1126/science.275.5302.967.
16. Yu, J., Yue, W., Wu, B., and Zhang, L. (2006) PUMA sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and irradiation, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2928-2936, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2429.
17. Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Okumura, K., Foster, N. R., O’Connell, M. J., Sargent, D. J., and Windschitl, H. E. (2008) Prognostic impact of Bim, Puma, and Noxa expression in human colon carcinomas, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 5810-5818, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5202.
18. Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., et al. (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature*, **463**, 899-905, doi: 10.1038/nature08822.
19. Wesarg, E., Hoffarth, S., Wiewrodt, R., Kröll, M., Biesterfeld, S., Huber, C., and Schuler M. (2007) Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, **121**, 2387-2394, doi: 10.1002/ijc.22977.
20. Faderl, S., Keating, M. J., Do, K. A., Liang, S. Y., Kantarjian, M., O’Brien, S., Garcia-Manero, G., Manshouri T., and Albitar, M. (2002) Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), *Leukemia*, **16**, 1045-1052, doi: 10.1038/sj.leu.2402540.
21. Han, Y., Wu, N., Jiang, M., Chu, Y., Wang, Z., Liu, H., Cao, J., Liu, H., Xu, B., and Xie, X. (2019) Long non-coding RNA MYOSLID functions as a competing endogenous RNA to regulate MCL-1 expression by sponging miR-29c-3p in gastric cancer, *Cell Prolif.*, 12678, doi: 10.1111/cpr.12678.
22. Zhang, J., Wang, S., Wang, L., Wang, R., Chen, S., Pan, B., Sun, Y., and Chen, H. (2015) Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review, *Oncol. Targets Ther.*, **8**, 3361-3369, doi: 10.2147/OTT.S89275.
23. Henriksen, R., Wilander, E., and Löberg, K. (1995) Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours, *Br. J. Cancer*, **72**, 1324-1329, doi: 10.1038/bjc.1995.509.
24. Chan, W. Y., Cheung, K. K., Schorge, J. O., Huang, L. W., Welch, et al. (2000) Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers, *Am. J. Pathol.*, **156**, 409-417, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64744-X.
25. Nakano, T., Liu, D., Nakashima, N., Yokomise, H., Nii, K., Go, T., Tarumi, S., Matsuura, N., Chang, S., Fujiwara, A., and Kakehi, Y. (2018) MCL-1 expression of non-small cell

lung cancer as a prognostic factor and MCL-1 as a promising target for gene therapy, *J. Clin. Oncol.*, **36**, doi: 10.1200/jco.2018.36.15_suppl.e24236.
26. Wu, X., Luo, Q., Zhao, P., Chang, W., Wang, Y., Shu, T., Ding, F., Li, B., and Liu, Z. (2019) MGMT-activated DUB3 stabilizes MCL1 and drives chemoresistance in ovarian cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2961-2966, doi: 10.1073/pnas.1814742116.
27. Williams, J., Lucas, P. C., Griffith, K. A., Choi, M., Fogoros, S., Hu, Y. Y., and Liu, J. R. (2005) Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease, *Gynecol. Oncol.*, **96** , 287-295, doi: 10.1016/j.ygyno.2004.10.026.
28. Reyna, D. E., Garner, T. P., Lopez, A., Kopp, F., Choudhary, G. S., et al. (2017) Direct activation of BAX by BTSA1 overcomes apoptosis resistance in acute myeloid leukemia,*Cancer Cell*, **32**, 490-505, doi: 10.1016/j.ccell.2017.09.001.
29. Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., and Shi, Y. X., et al. (2006) Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **10**, 375-388, doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.006.
30. Souers, A. J., Leverson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., et al. (2013) ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets, *Nat. Med.*, **19**, 202-208, doi: 10.1038/nm.3048.
31. Arellano, M. L., Borthakur, G., Berger, M., Luer, J., and Raza, A. (2014) A phase II, multicenter, open-label study of obatoclax mesylate in patients with previously untreated myelodysplastic syndromes with anemia or thrombocytopenia, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **14**, 534-539, doi: 10.1016/j.clml.2014.04.007.
32. Tao, Z. F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A. M., et al. (2014) Discovery of a potent and selective BCL-X Linhibitor with *in vivo* activity, *ACS Med. Chem. Lett.*, **5**, 1088-1093, doi: 10.1021/ml5001867.
33. Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., et al. (2016) The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models, *Nature*, **538**, 477-482, doi: 10.1038/nature19830.
34. Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., et al. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature*, 677-681, doi: 10.1038/nature03579.
35. Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., et al. (2008) ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor, *Cancer Res.*, **68**, 3421-3428, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
36. Mérino, D., Khaw, S. L., Glaser, S. P., Anderson, D. J., Belmont, L. D., et al. (2012) Bcl-2, Bcl-x L, and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells, *Blood*, **119**, 5807-5816, doi: 10.1182/blood-2011-12-400929.
37. Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., et al. (2016) Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **374**, 311-322, doi: 10.1056/NEJMoa1513257.
38. Seymour, J. F., Kipps, T. J., Eichhorst, B., Hillmen, P., D'Rozario, J., et al. (2018) Venetoclax–Rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **378**, 1107-1120, doi: 10.1056/NEJMoa1713976.
39. Casara, P., Davidson, J., Claperon, A., Toumelin-Braizat, G. L. Le, Vogler, M., et al. (2018) S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth, *Oncotarget*, **9**, 20075-20088, doi: 10.18632/oncotarget.24744.
40. Mason, K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., et al. (2007) Programmed anuclear cell death delimits platelet life span, *Cell*, **128**, 1173-1186, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.037.
41. Zhang, X., Liu, X., Zhou, D., and Zheng, G. (2020) Targeting anti-apoptotic BCL-2 family proteins for cancer treatment, *Future Med. Chem.*, **12**, 563-565, doi: 10.4155/fmc-2020-0004.
42. Hartman, M. L., and Czyz, M. (2020) BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease, *Cell Death Dis.,* doi: 10.1038/s41419-020-2417-0.
43. Lee, E. F., Dewson, G., Smith, B. J., Evangelista, M., Pettikiriarachchi, A., Dogovski, C., Perugini, M. A., Colman, P. M., and Fairlie, W. D. (2011) Crystal structure of a BCL-W domain-swapped dimer: Implications for the function of BCL-2 family proteins, *Structure*, **19**, 1467-1476, doi: 10.1016/j.str.2011.07.015.
44. Harvey, E. P., Hauseman, Z. J., Cohen, D. T., Rettenmaier, T. J., Lee, S., et al. (2020) Identification of a covalent molecular inhibitor of anti-apoptotic BFL-1 by disulfide tethering, *Cell Chem. Biol.*, **27**, 647-656.e6, doi: 10.1016/j.chembiol.2020.04.004.
45. Czabotar, P. E., Lee, E. F., van Delft, M. F., Day, C. L., Smith, B. J., Huang, D. C. S., Fairlie, W. D., Hinds, M. G., and Colman, P. M. (2007) Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6217-6222, doi: 10.1073/pnas.0701297104.
46. Pervushin, N. V., Senichkin, V. V., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Mcl-1 as a "barrier" in cancer treatment: can we target it now? *Intern. Rev. Cell Mol. Biol.*, pp. 23-55, doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.01.002.
47. Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., et al. (2018) Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia, *Nat. Commun.*, **9**, 5341, doi: 10.1038/s41467-018-07551-w.
48. Caenepeel, S., Brown, S. P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K. S., Chui, D., et al. (2018) AMG 176, a selective MCL1 inhibitor, is effective in hematological cancer models alone and in combination with established therapies, *Cancer Discov.*, **8**, 1582-1597, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0387.
49. Montero, J., and Letai, A. (2018) Why do BCL-2 inhibitorswork and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ.*, **25**, 56-64, doi: 10.1038/cdd.2017.183.
50. Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., and Letai, A. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members, *Cancer Cell*, **9**, 351-365, doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.027.
51. Sarosiek, K. A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P. D., Chang, W., et al. (2017) Developmental regulation of mitochondrial apoptosis by c-Myc governs age- and tissue-specific sensitivity to cancer therapeutics, *Cancer Cell*, **31**, 142-156, doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.011.
52. Xiang, Z., Luo, H., Payton, J. E., Cain, J., Ley, T. J., Opferman, J. T., and Tomasson, M. H. (2010) Mcl1 haploinsufficiency protects mice from Myc-induced acute myeloid leukemia, *J. Clin. Invest.*, **120**, 2109-2118, doi: 10.1172/JCI39964.
53. Moore, V. D. G., Brown, J. R., Certo, M., Love, T. M., Novina, C. D., and Letai, A. (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737, *J. Clin. Invest.*, **117**, 112-121, doi: 10.1172/JCI28281.
54. Pan, R., Hogdal, L. J., Benito, J. M., Bucci, D., Han, L., et al. (2014) Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia, *Cancer*

Discov., **4**, 362-675, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0609.
55. Kumar, S., Kaufman, J. L., Gasparetto, C., Mikhael, J., Vij, R., et al. (2017) Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma, *Blood*, **130**, 2401-2409, doi: 10.1182/blood-2017-06-788786.
56. Davids, M. S., Roberts, A. W., Seymour, J. F., Pagel, J. M., Kahl, B. S., et al. (2017) Phase i first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-hodgkin lymphoma, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 826-833, doi: 10.1200/JCO.2016.70.4320.
57. Moujalled, D. M., Pomilio, G., Ghiurau, C., Ivey, A., Salmon, J., et al. (2019) Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia, *Leukemia*, **33**, 905-917, doi: 10.1038/s41375-018-0261-3.
58. Zinzani, P. L., Topp, M. S., Yuen, S. L., Rusconi, C., Fleury, I., et al. (2016) Phase 2 study of Venetoclax plus Rituximab or Randomized Ven plus Bendamustine+ Rituximab (BR) Versus BR in patients with Relapsed/ Refractory follicular lymphoma: interim data, *Blood*, **128**, 617-617, doi: 10.1182/blood.v128.22.617.617.
59. Moreau, P., Chanan-Khan, A., Roberts, A. W., Agarwal, A. B., Facon, T., et al. (2017) Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM, *Blood*, **130**, 2392-2400, doi: 10.1182/blood-2017-06-788323.
60. Touzeau, C., Ryan, J., Guerriero, J., Moreau, P., Chonghaile, T. N., Gouill, S. Le, Richardson, P., Anderson, K., Amiot, M., and Letai, A. (2016) BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics, *Leukemia*, **30**, 761-764, doi: 10.1038/leu.2015.184.
61. Spencer, A., Rosenberg, A. S., Jakubowiak, A., Raje, N., Chatterjee, M., et al. (2019) A phase 1, first-in-human study of AMG 176, a selective MCL-1 inhibitor, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **19**, 53-54, doi: 10.1016/j.clml.2019.09.081.
62. Konopleva, M., Pollyea, D. A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., et al. (2016) Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia, *Cancer Discov.*, **6**, 1106-1117, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0313.
63. Lochmann, T. L., Floros, K. V., Naseri, M., Powell, K. M., Cook, W., et al. (2018) Venetoclax is effective in small-cell lung cancers with high BCL-2 expression, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 360-369, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1606.
64. Wong, K. Y., and Chim, C. S. (2020) Venetoclax, bortezomib and S63845, an MCL1 inhibitor, in multiple myeloma, *J. Pharm. Pharmacol.*, **72**, 728-737, doi: 10.1111/jphp.13240.
65. Yasuda, Y., Ozasa, H., Kim, Y. H., Yamazoe, M., Ajimizu, H., et al. (2020) MCL1 inhibition is effective against a subset of small-cell lung cancer with high MCL1 and low BCL-XL expression, *Cell Death Dis.*, **11**, 1-15, doi: 10.1038/s41419-020-2379-2.
66. Khaw, S. L., Mérino, D., Anderson, M. A., Glaser, S. P., Bouillet, P., Roberts, A. W., and Huang, D. C. S. (2014) Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199, *Leukemia*, **28**, 1207-1215, doi: 10.1038/leu.2014.1.
67. Pham, L. V., Huang, S., Zhang, H., Zhang, J., Bell, T., et al. (2018), Strategic therapeutic targeting to overcome venetoclax resistance in aggressive B-cell lymphomas, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 3967-3980, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3004.
68. Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., Souers, A. J., Phillips, D. C., Smith, M. R., and His, E. D. (2016) Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells, *Oncotarget*, **7**, 7000-7010, doi: 10.18632/oncotarget.12132.
69. Kontro, M., Kumar, A., Majumder, M. M., Eldfors, S., Parsons, A., et al. (2017) HOX gene expression predicts response to BCL-2 inhibition in acute myeloid leukemia, *Leukemia*, **31**, 301-309, doi: 10.1038/leu.2016.222.
70. Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., et al. (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome, *Blood*, **109**, 3489-3495, doi: 10.1182/blood-2006-08-040410.
71. Touzeau, C., Dousset, C., Gouill, S. Le, Sampath, D., Leverson, J. D., Souers, A. J., Maïga, S., Béné, M. C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot M. (2014) The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma, *Leukemia*, **28**, 210-212, doi: 10.1038/leu.2013.216.
72. Chan, S. M., Thomas, D., Corces-Zimmerman, M. R., Xavy, S., Rastogi, S., Hong, W. J., Zhao, F., Medeiros, B. C., Tyvoll, D. A., and Majeti, R. (2015) Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia, *Nat. Med.*, **21**, 178-184, doi: 10.1038/nm.3788.
73. Blombery, P., Thompson, E. R., Nguyen, T., Birkinshaw, R. W., Gong, J. N., et al. (2020) Multiple BCL2 mutations cooccurring with Gly101Val emerge in chronic lymphocytic leukemia progression on venetoclax, *Blood*, **135**, 773-777, doi: 10.1182/blood.2019004205.
74. Tahir, S. K., Smith, M. L., Hessler, P., Rapp, L. R., Idler, K. B., Park, C. H., Leverson, J. D., and Lam, L. T. (2017) Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it, *BMC Cancer*, **17**, 399, doi: 10.1186/s12885-017-3383-5.
75. Mazumder, S., Choudhary, G. S., Al-Harbi, S., and Almasan, A. (2012) Mcl-1 phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells, *Cancer Res.*, **72**, 3069-3079, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4106.
76. Konopleva, M., Milella, M., Ruvolo, P., Watts, J. C., Ricciardi, M. R., et al. (2012) MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis *via* prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex, *Leukemia*, **26**, 778-787, doi: 10.1038/leu.2011.287.
77. Choudhary, G. S., Al-Harbi, S., Mazumder, S., Hill, B. T., Smith, M. R., Bodo, J., His, E. D., and Almasan, A. (2015) MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies, *Cell Death Dis.*, **6**, 1593, doi: 10.1038/cddis.2014.525.
78. Fresquet, V., Rieger, M., Carolis, C., García-Barchino, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2014) Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma, *Blood*, **123**, 4111-4119, doi: 10.1182/blood-2014-03-560284.
79. Blombery, P., Anderson, M. A., Gong, J. N., Thijssen, R., Birkinshaw, R. W., et al. (2019) Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in BCL2 confers resistance to venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Discov.*, **9**, 342-353, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1119.
80. Tausch, E., Close, W., Dolnik, A., Bloehdorn, J., Chyla, B., Bullinger, L., Döhner, H., Mertens, D., and Stilgenbauer, S. (2019) Venetoclax resistance and acquired BCL2 muta-

tions in chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica*, **104**, 434-437, doi: 10.3324/haematol.2019.222588.
81. Ramsey, H. E., Fischer, M. A., Lee, T., Gorska, A. E., Arrate, M. P., et al. (2018) A novel MCL1 inhibitor combined with venetoclax rescues venetoclax-resistant acute myelogenous leukemia, *Cancer Discov.*, **8**, 1566-1581, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0140.
82. Lee, E. F., Harris, T. J., Tran, S., Evangelista, M., Arulananda, S., et al. (2019) BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival, *Cell Death Dis.*, **10**, 1-14, doi: 10.1038/s41419-019-1568-3.
83. Khaw, S. L., Suryani, S., Evans, K., Richmond, J., Robbins, A., et al. (2016) Venetoclax responses of pediatric ALL xenografts reveal sensitivity of MLL-rearranged leukemia, *Blood*, **128**, 1382-1395, doi: 10.1182/blood-2016-03-707414.
84. Weeden, C. E., Ah-Cann, C., Holik, A. Z., Pasquet, J., Garnier, J. M., Merino, D., Lessene, G., and Asselin-Labat, M. L. (2018) Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition, *Oncogene*, **37**, 4475-4488, doi: 10.1038/s41388-018-0268-2.
85. Debrincat, M. A., Josefsson, E. C., James, C., Henley, K. J., Ellis, S., et al. (2012) Mcl-1 and Bcl-x L coordinately regulate megakaryocyte survival, *Blood*, **119**, 5850-5858, doi: 10.1182/blood-2011-12-398834.
86. Chen, J., Jin, S., Abraham, V., Huang, X., Liu, B., Mitten, M. J., et al. (2011) The Bcl-2/Bcl-X L/Bcl-w inhibitor, navitoclax, enhances the activity of chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cancer Ther.*, **10**, 2340-2349, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0415.
87. Corcoran, R. B., Cheng, K. A., Hata, A. N., Faber, A. C., Ebi, H., et al. (2013) Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models, *Cancer Cell*, **23**, 121-128, doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.007.
88. Luedtke, D. A., Su, Y., Liu, S., Edwards, H., Wang, Y., Lin, H., Taub, J. W., and Ge, Y. (2018) Inhibition of XPO1 enhances cell death induced by ABT-199 in acute myeloid leukaemia via Mcl-1, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 6099-6111, doi: 10.1111/jcmm.13886.
89. Luedtke, D. A., Su, Y., Ma, J., Li, X., Buck, S. A., et al. (2020) Inhibition of CDK9 by voruciclib synergistically enhances cell death induced by the Bcl-2 selective inhibitor venetoclax in preclinical models of acute myeloid leukemi, *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **5**, 1-11, doi: 10.1038/s41392-020-0112-3.
90. Cidado, J., Boiko, S., Proia, T., Ferguson, D., Criscione, S. W., et al. (2020) AZD4573 is a highly selective CDK9 inhibitor that suppresses Mcl-1 and induces apoptosis in hematologic cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **26**, 922-934, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1853.
91. Patel, V. M., Balakrishnan, K., Douglas, M., Tibbitts, T., Xu, E. Y., et al. (2017) Duvelisib treatment is associated with altered expression of apoptotic regulators that helps in sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to venetoclax (ABT-199), *Leukemia*, **31**, 1872-1881, doi: 10.1038/leu.2016.382.
92. Matulis, S. M., Gupta, V. A., Nooka, A. K., Hollen, H. V., Kaufman, J. L., Lonial, S., and Boise, L. H. (2016) Dexamethasone treatment promotes Bcl-2 dependence in multiple myeloma resulting in sensitivity to venetoclax, *Leukemia*, **30**, 1086-1093, doi: 10.1038/leu.2015.350.
93. The, T. C., Nguyen, N. Y., Moujalled, D. M., Segal, D., Pomilio, G., et al. (2018) Enhancing venetoclax activity in acute myeloid leukemia by co-targeting MCL1, *Leukemia*, **32**, 303-312, doi: 10.1038/leu.2017.243.
94. Mali, R. S., Zhang, Q., DeFilippis, R., Cavazos, A., Kuruvilla, V. M., et al. (2020) Venetoclax combines synergistically with FLT3 inhibition to effectively target leukemic cells in FLT3-ITD$^+$ acute myeloid leukemia models, *Haematologica*, 244020, doi: 10.3324/haematol.2019.244020.
95. Cathelin, S., Sharon, D., Subedi, A., Cojocari, D., Phillips, D. C., et al. (2018) Combination of enasidenib and venetoclax shows superior anti-leukemic activity against IDH2 mutated AML in patient-derived xenograft models, *Blood*, **132**, 562-562, doi: 10.1182/blood-2018-99-119688.
96. Koch, R., Christie, A. L., Crombie, J. L., Palmer, A. C., Plana, D., et al. (2019) Biomarker-driven strategy for MCL1 inhibition in T-cell lymphomas, *Blood*, **133**, 566-575, doi: 10.1182/blood-2018-07-865527.
97. Nangia, V., Siddiqui, F. M., Caenepeel, S., Timonina, D., Bilton, S. J., et al. (2018) Exploiting MCL1 dependency with combination MEK + MCL1 inhibitors leads to induction of apoptosis and tumor regression in KRAS-Mutant non-small cell lung cancer, *Cancer Discov.*, **8**, 1598-1613, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0277.
98. Merino, D., Whittle, J. R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J. N., et al. (2017) Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer, *Sci. Transl. Med.*, **9**, 401, doi: 10.1126/scitranslmed.aam7049.
99. Leverson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., et al. (2015) Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy, *Sci. Transl. Med.*, **7**, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4642.
100. Shoemaker, A. R., Oleksijew, A., Bauch, J., Belli, B. A., Borre, T., et al. (2006) A small-molecule inhibitor of Bcl-XL potentiates the activity of cytotoxic drugs *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, **66**, 8731-8739, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0367.
101. DiNardo, C. D., Pratz, K., Pullarkat, V., Jonas, B. A., Arellano, M., et al. (2019) Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia, *Blood*, **133**, 7-17, doi: 10.1182/blood-2018-08-868752.
102. Jin, S., Cojocari, D., Purkal, J. J., Popovic, R., Talaty, N. N., et al. (2020) 5-Azacitidine induces NOXA to prime AML cells for venetoclax-mediated apoptosis, *Clin. Cancer Res.*, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-19-1900.
103. Pollyea, D. A., Stevens, B. M., Jones, C. L., Winters, A., Pei, S., et al. (2018) Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia, *Nat. Med.*, **24**, 1859-1866, doi: 10.1038/s41591-018-0233-1.
104. Jain, N., Keating, M., Thompson, P., Ferrajoli, A., Burger, J., et al. (2019) Ibrutinib and venetoclax for first-line treatment of CLL, *N. Engl. J. Med.*, **380**, 2095-2103, doi: 10.1056/NEJMoa1900574.
105. Tam, C. S., Anderson, M. A., Pott, C., Agarwal, R., Handunnetti, S., et al. (2018) Ibrutinib plus venetoclax for the treatment of mantle-cell lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **378**, 1211-1223, doi: 10.1056/NEJMoa1715519.
106. Cervantes-Gomez, F., Lamothe, B., Woyach, J. A., Wierda, W. G., Keating, M. J., Balakrishnan, K., and Gandhi, V. (2015) Pharmacological and protein profiling suggests venetoclax (ABT-199) as optimal partner with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 3705-3715, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2809.

TARGETING Bcl-2 FAMILY PROTEINS: WHAT, WHERE, WHEN?

Review

V. V. Senichkin[1], N. V. Pervushin[1], A. P. Zuev[1], B. Zhivotovsky[1,2], and G. S. Kopeina[1]*

[1] *Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: lirroster@gmail.com*

[2] *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden*

Received July 15, 2020
Revised July 15, 2020
Accepted August 8, 2020

Proteins of the Bcl-2 family are known as regulators of apoptosis, one of the most studied forms of programmed cell death. The Bcl-2 protein family is represented by both pro- and antiapoptotic members. Antiapoptotic proteins are often exploited by tumor cells to avoid their death, thus playing an important role in carcinogenesis and in acquisition of resistance to various therapeutic agents. Therefore, antiapoptotic proteins represent attractive targets for cancer therapy. A detailed investigation of interactions between Bcl-2 family proteins resulted in the development of highly selective inhibitors of individual antiapoptotic members. These agents are currently being actively studied at the preclinical and clinical stages and represent a promising therapeutic strategy, which is highlighted by approval of venetoclax, a selective inhibitor of Bcl-2, for medical use. Meanwhile, inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins has significant therapeutic potential that is yet to be revealed. In the coming era of precision medicine, a detailed study of the mechanisms responsible for the sensitivity or resistance of tumor cells to various therapeutic agents, as well as the search for the most effective combinations, is of great importance. Here, we discuss mechanisms of how the Bcl-2 family proteins function, principles of their inhibition by small molecules, success of this approach in cancer therapy, and, eventually, biochemical features that can be exploited to improve the use of Bcl-2 family inhibitors as anticancer drugs.

Keywords: apoptosis, Bcl-2 family, cancer therapy, BH3-mimetics

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1442 – 1451

УДК 577.24

НАРУШЕНИЕ КООРДИНИРОВАННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ BIF-1, BAX И Beclin-1 ПРИ ПЕРВИЧНОЙ И МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЕ

© 2020 Ж. Франгеж[1], С.М.С. Джафари[2], Р.Е. Хангер[2], Г.-У. Симон[1,3,*]

[1] *Institute of Pharmacology, University of Bern, Bern, Switzerland; E-mail: hus@pki.unibe.ch*

[2] *Department of Dermatology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland*

[3] *Department of Clinical Immunology and Allergology, Sechenov University, 119991 Moscow, Russia*

Поступила в редакцию 08.07.2020
После доработки 08.07.2020
Принята к публикации 12.07.2020

Меланома является одной из наиболее агрессивных и устойчивых к действию лекарств форм рака. Несмотря на появление новых многообещающих стратегий для её лечения, прогноз у больных с метастатической меланомой остается плохим. Он часто ассоциируется с большой вероятностью рецидива болезни. Эндофилин B1, также известный как BIF-1, является многофункциональным белком, который вовлечен в различные биологические процессы, включая аутофагию и апоптоз. BIF-1 участвует в развитии апоптоза, связываясь с BAX и способствуя его транслокации на внешнюю мембрану митохондрий. С другой стороны, показано, что BIF-1 может взаимодействовать с Beclin-1 через белок UVRAG и способствовать процессу аутофагии. В ряде работ была предположена значительная роль BIF-1 в развитии и прогрессировании рака. Например, было обнаружено, что экспрессия BIF-1 снижается как в случае первичной меланомы, так и при её метастатической форме, и снижение уровня экспрессии BIF-1 ассоциируется с общей выживаемостью больных с меланомой. В настоящей работе показано, что у больных с меланомой снижена экспрессия Beclin-1 и активной формы белка BAX. Однако при отчетливо выраженной положительной корреляции между экспрессией BIF-1 и Beclin-1, а также между белками BIF-1 и BAX доброкачественных невусов, эта корреляция утрачивалась в клетках первичной и метастатической меланомы. Эти данные свидетельствуют о том, что есть нарушение функционирования проксимальных молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию BIF-1, Beclin-1 и BAX при первичной и метастатической меланоме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, аутофагия, BAX, Beclin-1, BIF-1, меланома.

DOI: 10.31857/S0320972520100103

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на появление новых обещающих терапевтических подходов, таких как иммунотерапия или таргетная терапия, прогноз больных с метастатической меланомой остается плохим, который часто ассоциируется с высокой частотой рецидива опухолей. К сожалению, в настоящее время прогностические факторы, которые используются в клинике, часто недостаточны для выявления больных с высоким риском развития меланомы. BIF-1, также известный как эндофилин B1 или взаимодействующий с BAX белок 1 (BAX-interacting protein 1), принадлежит к белковому семейству эндофилинов, которые являются цитоплазматическими белками, участвующими во многих биологических процессах, таких как динамика митохондриальных мембран, апоптоз, аутофагия, извлечение синаптических везикул, а также трафик рецепторных тирозиновых киназ и внутриклеточная передача сигнала [1]. Ранее было показано, что экспрессия BIF-1 при первичной и метастатической меланоме снижается по сравнению со здоровыми тканями, и пониженные уровни BIF-1 ассоциируются с менее благоприятным клиническим исходом [2].

Белок BIF-1 чаще обнаруживается в цитозоле. Часть белка также располагается во внутриклеточных мембранных компартментах, включая комплекс Гольджи и митохондрии [3–6]. Было показано, что этот белок необходим для поддержания морфологии и функционирования митохондрий [2, 4]. После того, как было установлено, что этот белок является взаимодействующим партнером белка BAX, в нескольких работах была подробно изучена его роль в процессе апоптоза. Кроме того, было показано, что снижение экспрессии BIF-1 в клетках HeLa вызывало задержку конформационных изменений белков BAX и BAK, высвобождение цитохрома *c* и активацию каспазы-3, индуцированную различными внут-

* Адресат для корреспонденции.

ренними сигналами гибели клетки [3, 6]. Кроме участия в активации белка BAX, также было показано, что BIF-1 образует комплекс с Beclin-1 через белок UVRAG и положительно модулирует образование аутофагосом [7]. Участие BIF-1 в аутофагии и апоптозе привело к появлению работ, посвященных изучению его роли в канцерогенезе. Показано, что BIF-1 экспрессируется в незначительных количествах, за исключением меланомы [2], при инвазивных формах рака мочевого пузыря и желчного пузыря [8], а также в случае колоректальной аденокарциномы [9]. Напротив, в случае гепатоцеллюлярной карциномы обнаружено повышение его экспрессии [10]. Более того, отсутствие BIF-1 в клетках меланомы приводило к повышенному образованию АТФ, метаболическому закислению клеток и повышению интенсивности митохондриального дыхания, что ассоциировалось с большей степенью пролиферации клеток как *in vitro,* так и *in vivo* [2].

Поскольку BIF-1 играет роль в процессах апоптоза и аутофагии, было решено изучить корреляцию между экспрессией апоптотических или аутофагических белков и BIF-1 в доброкачественных невусах по сравнению с тканями при первичной и метастатической меланоме. Показано, что экспрессия активной формы белка BAX у больных с метастатической меланомой понижена. Кроме того, обнаружено, что у больных с метастатической меланомой также снижена, по сравнению с доброкачественными невусами, экспрессия основного аутофагического белка Beclin-1. Более того, в клетках первичной и метастатической меланомы исчезает положительная корреляция между BIF-1 и активной формой BAX, белком Beclin-1 или белком LC3B, являющимся маркером аутофагии. Эти данные свидетельствуют о том, что при первичной и метастатической меланоме нарушается регуляция экспрессии белков BIF-1, Beclin-1 и BAX.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

План исследования и больные. Тканевой микрочип (TMA – Tissue Micro Array) был создан в Отделении патологии (г. Берн, Швейцария). Выполнение данной работы было одобрено Комитетом по этике Кантона (г. Берн). Целью данного когортного исследования являлось изучение роли BIF-1, BAX, LC3B и Beclin-1 в патогенезе меланомы кожи. TMA включала сохраненные образцы ткани 65 меланоцитических невусов, 41 первичной и 30 метастатических меланом, полученных за период от 2003 по 2015 г. от больных в Отделении дерматологии (Inselspital, Берн).

Иммуногистохимия. Иммуногистохимический анализ проводили как описано ранее [2, 11, 12]. Погруженные в парафин кусочки ткани освобождали от парафина и воды с помощью различных разведений этанола, и затем проводили выявление антигена. Иммуногистохимическое окрашивание осуществляли на приборе Dako REAL Detection System, используя набор с щелочной фосфатазой (Alkaline Phosphatase/RED kit), также содержащий вторичные антитела, в соответствии с инструкциями производителя (Agilent Technologies, K5005). Были использованы следующие первичные антитела: моноклональные антитела против эндофилина B1/BIF-1 (Novus Biologicals, NBP2-24733; 1:100), кроличьи поликлональные антитела против Beclin-1 (Abgent, США; 1:100), моноклональные антитела против белка BAX (клон 6A7, Santa Cruz Biotechnology, США; 1:100) и кроличьи поликлональные антитела против белка LC3B (Abgent, 1:100). Интенсивность окрашивания определяли с помощью программы QuPath [2, 13]. Полученные данные были представлены в виде средних значений оптической плотности (OD) или же использовали программу Image Pro Plus, и данные представляли в виде интегрированной оптической плотности (IOD – integrated optical density) [11, 12].

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD) с использованием программного пакета Prism Software v6 (GraphPad, Ла Джолла, США). Достоверные значения были представлены следующим образом: $p \geq 0{,}05^{ns}$, $p \leq 0{,}05$*, $p \leq 0{,}01$**, $p \leq 0{,}001$*** и $p \leq 0{,}0001$****. Для проведения анализа данные больных с первичной и метастатической меланомой были разделены на две группы в соответствии со средними значениями экспрессии активной формы белка BAX или Beclin-1 в их опухолях. Группа «Высокий уровень экспрессии BAX или Beclin-1» включала больных с уровнем экспрессии BAX или Beclin-1, превышающим среднее значение экспрессии для всей популяции. Группа «Низкий уровень экспрессии BAX или Beclin-1» включала больных с уровнем белков BAX или Beclin-1, который был ниже среднего значения для популяции в целом. Общая выживаемость (OS – overall survival) была определена как время от начала исследования до смерти от любой причины. Выживаемость в отсутствии заболевания (DFS – disease-free survival) была определена как время от случайного распределения до повторного заболевания или его прогрессирования. Это было проанализировано с помощью логрангового критерия и показано на графике в виде кривых выживаемости Каплана–Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Снижение экспрессии активной формы белка BAX у больных с метастатической меланомой. Ранее нами было предположено, что белок BIF-1 является опухолевым репрессором при меланоме, так как он ограничивает рост опухоли, ингибируя функционирование митохондрий. В ряде работ было показано, что BIF-1 усиливает апоптоз, способствуя конформационным изменениям в белках BAX и BAK и транслокации белка BAX в митохондрию [3, 6]. Апоптоз является ключевым механизмом клеточной гибели, с помощью которого удаляются поврежденные клетки, а также трансформированные клетки, которые потенциально могут превратиться в опухолевые клетки. Было решено сначала изучить экспрессию конформационно активной формы белка BAX на различных стадиях развития меланомы с использованием изготовленного на заказ тканевого микрочипа (TMA) [2]. TMA содержал 64 образца доброкачественных невусов, 41 образец первичной меланомы и 30 образцов метастатической меланомы. Иммуногистохимический анализ с помощью TMA выявил постепенное снижение экспрессии активного BAX из добро-

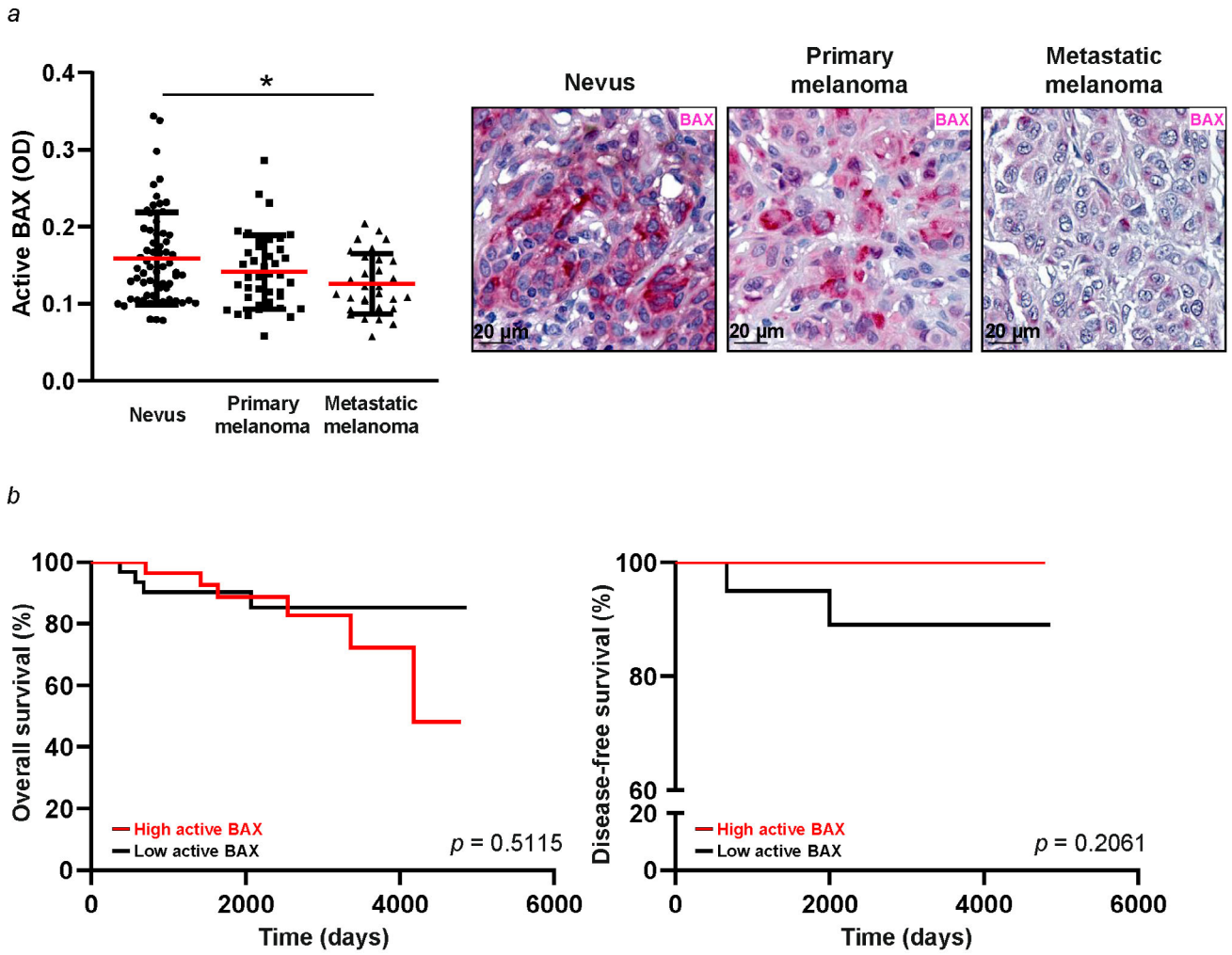


Рис. 1. Экспрессия активной мономерной формы белка BAX при метастатических меланомах понижена по сравнению с доброкачественными меланоцитическими невусами. *a* – Иммуногистохимия. Измерение интенсивности сигнала активной мономерной формы белка BAX. Представлены значения интенсивности IOD для отдельных больных. Красными линиями показаны средние из всех значений. Статистические различия были проанализированы с помощью одностороннего метода ANOVA с использованием теста Крускал–Уоллис (Kruskal–Wallis) и пост-хок теста Данна (Dunn's *post hoc* test) (левая панель). Представлены репрезентативные изображения 65 доброкачественных невусов, 41 первичной и 30 метастатических меланом (правая панель); *b* – те же самые больные, находящиеся под наблюдением, были разбиты на две группы («повышенная» и «пониженная») на основании средних значений экспрессии белка BAX в их опухолях. Показаны кривые Каплан–Мейер (Kaplan–Meier) для общей выживаемости и для не связанной с болезнями выживаемостью. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

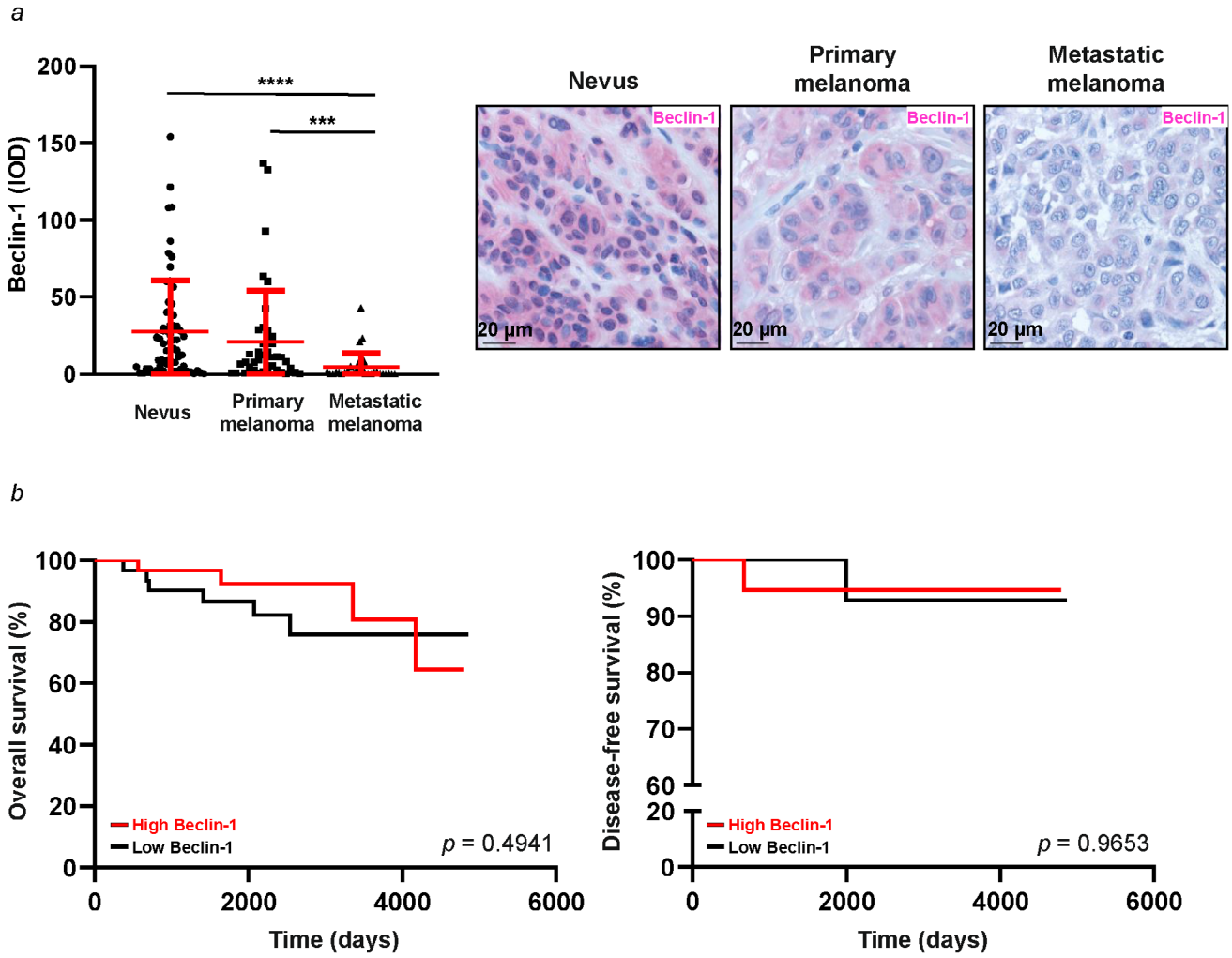


Рис. 2. Экспрессия белка Beclin-1 при метастатических меланомах понижена по сравнению с доброкачественными меланоцитическими невусами. *a* – Иммуногистохимия. Измерение интенсивности сигнала белка Beclin-1. Представлены значения интенсивности (интегрированная оптическая плотность (IOD) для отдельных больных). Красными линиями представлены средние показатели всех значений. Статистические различия были проанализированы с помощью одностороннего метода ANOVA с использованием теста Крускал-Уоллис (Kruskal-Wallis) и пост-хок теста Данна (Dunn's *post hoc* test) (левая панель). Представлены репрезентативные изображения 65 доброкачественных невусов, 41 первичной и 30 метастатических меланом (правая панель); *b* – те же самые больные, находящиеся под наблюдением, были разбиты на две группы («повышенная» и «пониженная») на основании средних значений экспрессии белка Beclin-1 в их опухолях. Показаны кривые Каплан–Мейер для общей и для не связанной с болезнями выживаемостью

качественных невусов, далее из первичной меланомы и наконец из метастатической меланомы (рис. 1, *a*). Экспрессия активного белка BAX существенно снижалась в метастатической меланоме (среднее значение IOD = 0,1116 ± 0,03897) в сравнении с доброкачественными невусами (среднее значение IOD = 0,1588 ± 0,05966). К нашему удивлению, дальнейшая разбивка больных согласно их средней экспрессии белка BAX в группах с повышенной IOD > 0,1344 для первичной меланомы и IOD > 0,1274 в случае метастатической меланомы или с низкой экспрессией активной формы белка BAX показало, что активная форма BAX не влияет на показатели OS или DFS больных меланомой (рис. 1, *b*).

Пониженная экспрессия белка Beclin-1 у больных с метастатической меланомой. Помимо апоптоза, также показано, что существует корреляция между белком BIF-1 и процессом аутофагии. BIF-1 взаимодействует с Beclin-1, связываясь с белком UVRAG, действует как положительный медиатор PI(3)-киназ III класса и аутофагии [7]. Далее была изучена экспрессия белка Beclin-1 в доброкачественных невусах и тканях у больных меланомой. Обнаружено небольшое снижение уровня экспрессии Beclin-1 при первичной меланоме и выраженное снижение экспрессии Beclin-1 у больных с метастатической меланомой по сравнению с доброкачественными невусами (рис. 2, *a*). Интересно, что разделение больных

согласно усредненной экспрессии белка Beclin-1 в группах с повышенной (IOD > 9316,11 при первичной меланоме и IOD > 808,272 в случае метастатических меланом) экспрессией или в случае пониженной экспрессии этого белка показало, что уровень экспрессии белка Beclin-1 не оказывает влияния на показатели OS или DFS больных меланомой (рис. 2, *b*).

При первичной или метастатической меланоме исчезает корреляция между экспрессией BIF-1 и активных форм белка BAX, Beclin-1 или LC3B. Поскольку BIF-1 связан с аутофагией и апоптозом и в связи с тем, что эти процессы важны для предотвращения развития и прогрессирования опухолей, нами была изучена возможность того, что белки, вовлеченные в процессы аутофагии или апоптоза, имеют картину экспрессии, сходную с таковой в случае экспрессии белка BIF-1 в доброкачественных невусах и у больных меланомой. С этой целью мы проанализировали корреляцию между BIF-1 и активной формой белка BAX и Beclin-1. Была выявлена строгая корреляция между BIF-1 и активной формой BAX в доброкачественных невусах (рис. 3, *a*), что позволяет предположить сходный или одинаковый механизм регуляции этих двух белков в меланоцитах. Интересно, что в тканях первичной и метастатической меланом не обнаружена корреляция между BIF-1 и активной формой белка BAX (рис. 3, *b* и *c*).

Кроме того, помимо взаимодействия с белком BAX, BIF-1 также образует комплекс с белком Beclin-1 через белок UVRAG, оказывая влияние на индукцию аутофагии [7]. Beclin-1 явля-

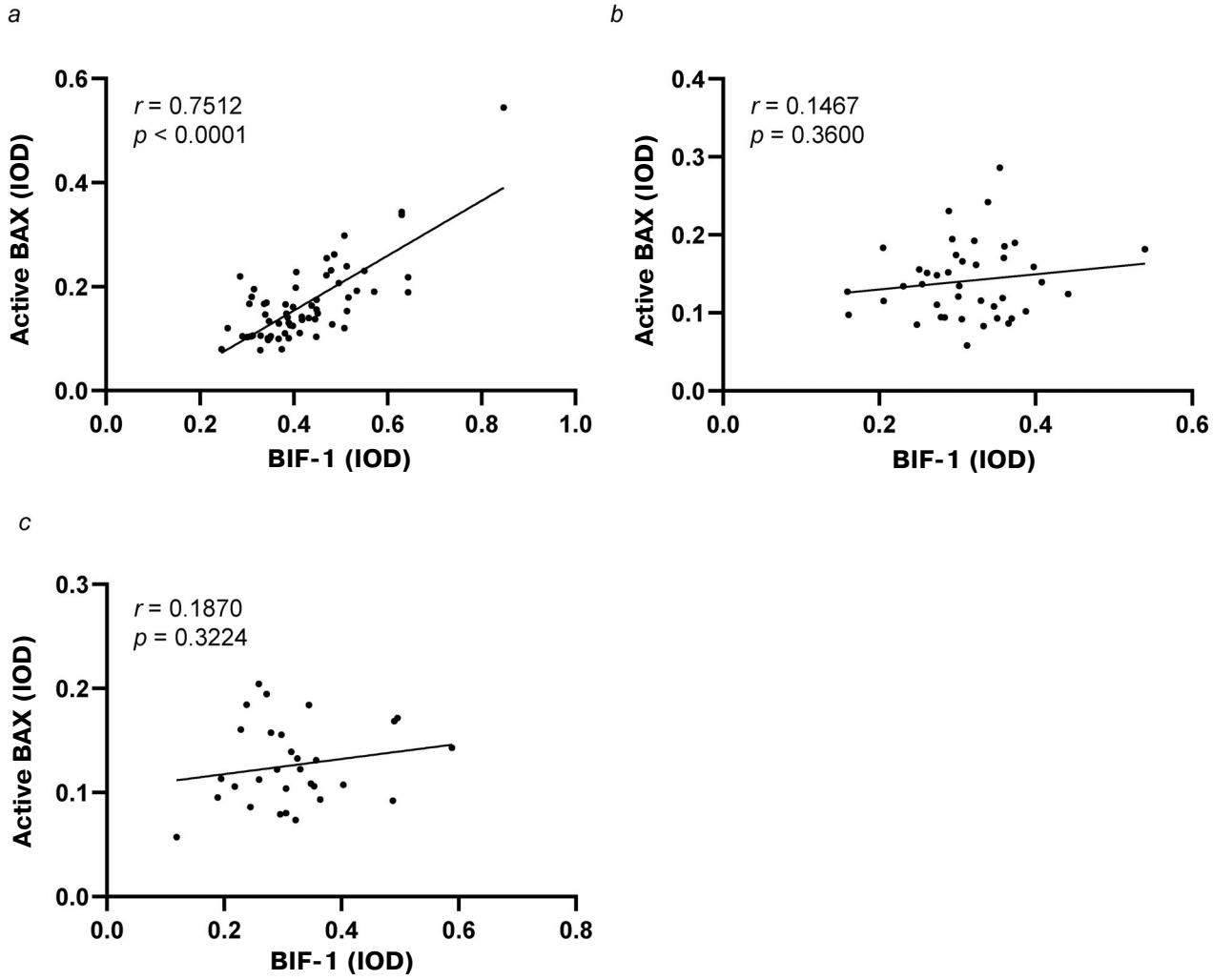


Рис. 3. BIF-1 положительно коррелирует с активной мономерной формой белка BAX в доброкачественных невусах и не выявлено корреляции в образцах тканей при первичной или метастатической меланоме. *a*–*c* – На точечной диаграмме показана корреляция между средними значениями IOD активной мономерной формы белка BAX и белком BIF-1 в образцах из доброкачественных невусов (*a*), первичной меланомы (*b*) и метастатической меланомы (*c*). Представленные значения *r* и *p* показывают корреляцию Пирсона

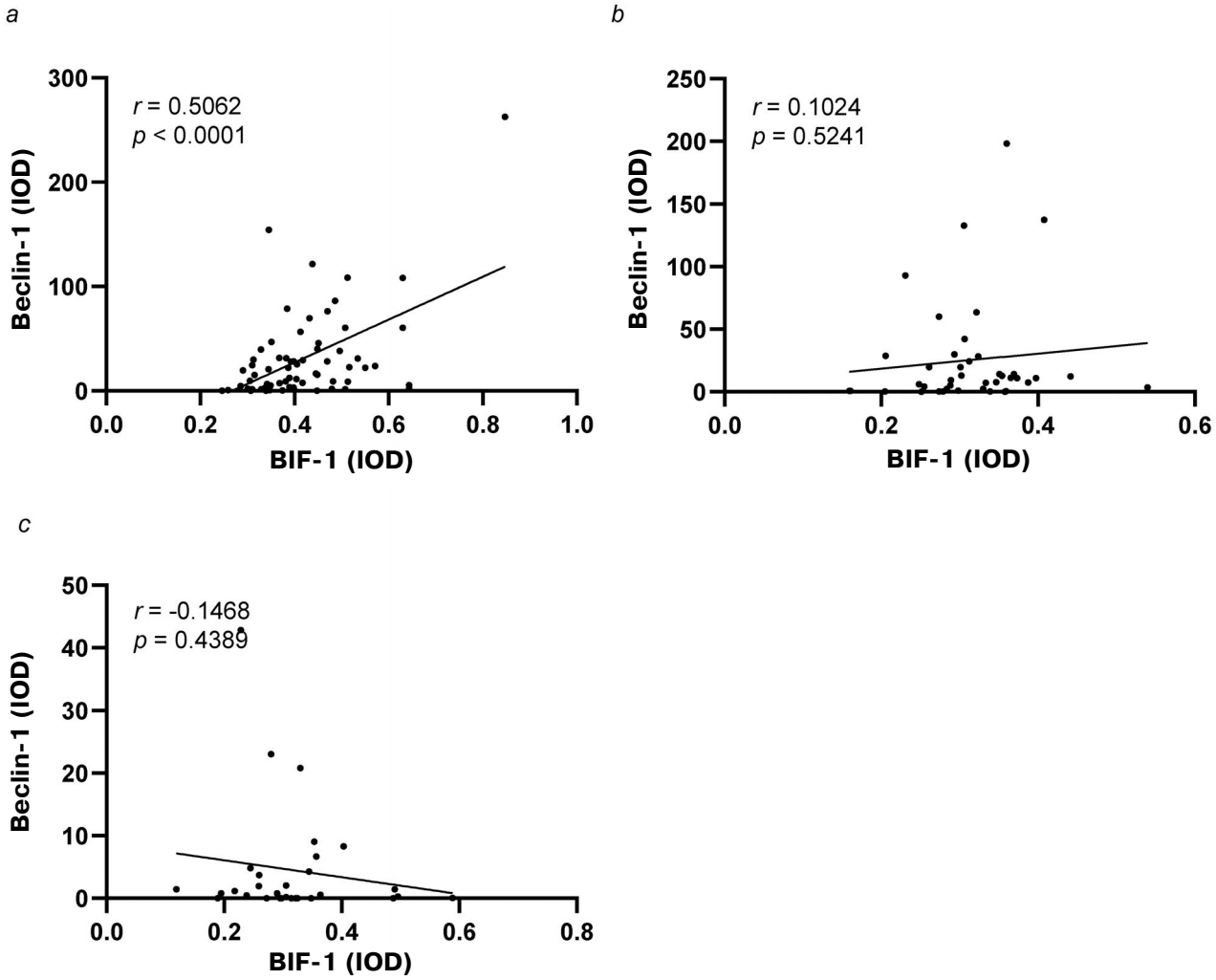


Рис. 4. BIF-1 положительно коррелирует с белком Beclin-1 в доброкачественных невусах, и нет корреляции в образцах тканей при первичной или метастатической меланоме. (*a*–*c*) На точечной диаграмме показана корреляция между значениями IOD для белка Beclin-1 и средними значениями оптической плотности белка BIF-1 в образцах доброкачественных невусов (*a*), первичной меланомы (*b*) и метастатической меланомы (*c*). Представленные значения *r* и *p* показывают корреляцию Пирсона

ется центральным регулятором процесса аутофагии и действует на начальной стадии аутофагии, участвуя в образовании мембраны, которая охватывает цитоплазматический материал [14]. Поэтому также была изучена экспрессия белка Beclin-1 и выявлена строгая корреляция между активной формой белка BAX и белком Beclin-1 в доброкачественных невусах (рис. 4, *a*) и отсутствие такой корреляции в тканях при первичной и метастатической меланоме (рис. 4, *b*, *c*).

В связи с тем, что BIF-1 является положительным регулятором аутофагии, мы также изучили корреляцию между экспрессией BIF-1 и экспрессией белка LC3B – широко используемого маркера аутофагии. После расщепления и связывания с фосфатилдилэтаноламином (PE) LC3 обнаруживается на внутренней и внешней мембранах аутофагосом [15]. В соответствии с ролью BIF-1 в процессе аутофагии была обнаружена строгая положительная корреляция между уровнем белков BIF-1 и LC3B в доброкачественных невусах (рис. 5, *a*) и отсутствие такой корреляции в тканях при первичной и метастатической меланомах (рис. 5, *b*, *c*). Эти результаты означают, что проксимальная регуляция экспрессии BIF-1, Beclin-1 и BAX в клетках первичной и метастатической меланом нарушена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок BIF-1 был ассоциирован с несколькими биологическими процессами, в частности, с апоптозом, во время которого этот белок взаи-

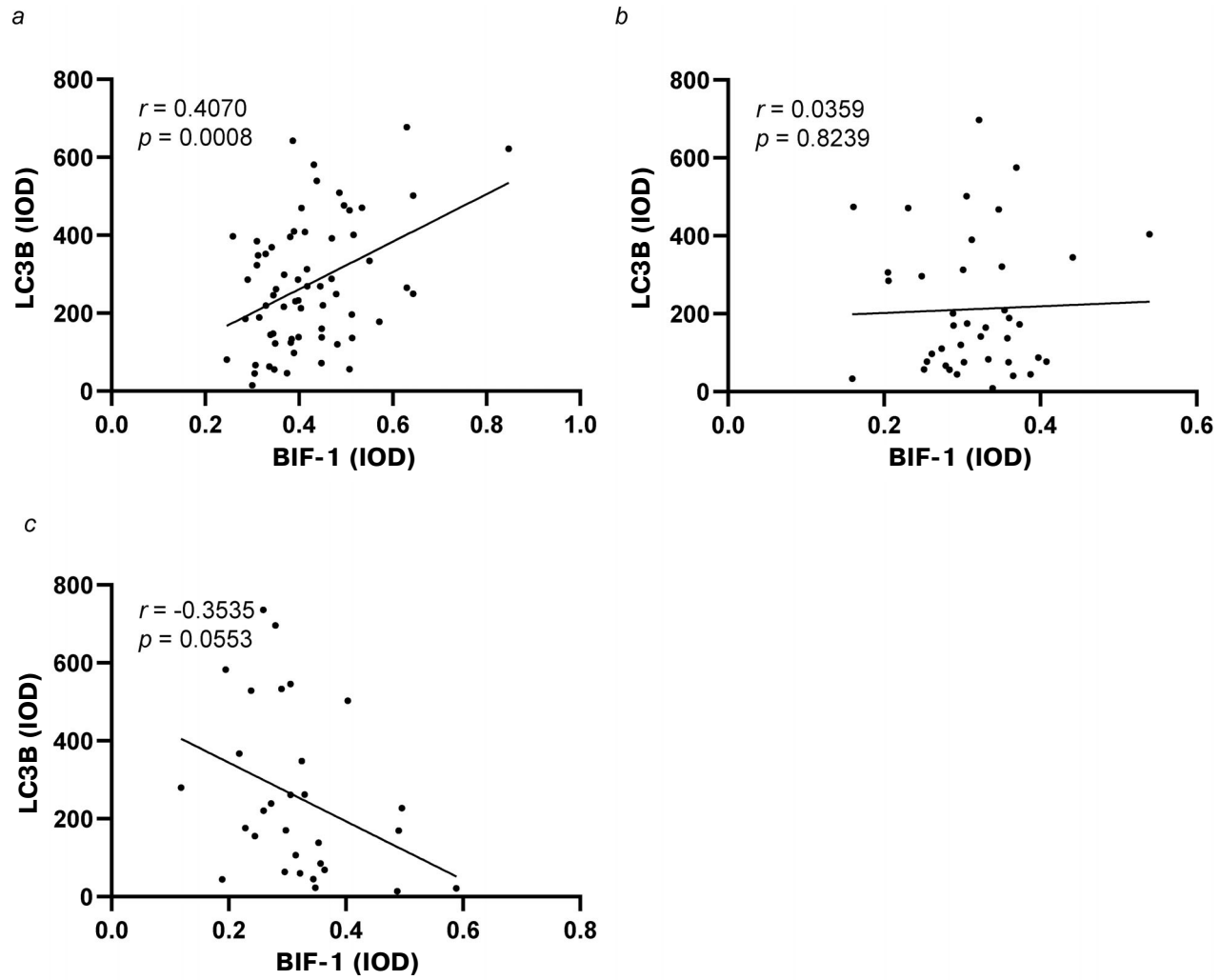


Рис. 5. BIF-1 положительно коррелирует с LC3B в доброкачественных невусах и нет такой корреляции в образцах первичной или метастатической меланом. *a*–*c* – На точечной диаграмме показана корреляция между значениями IOD для белка LC3B и средними значениями IOD для белка BIF-1 в образцах тканей доброкачественных невусов (*a*), первичной меланомы (*b*) и метастатической меланомы (*c*). Представленные значения *r* и *p* показывают корреляцию Пирсона

модействует с белком BAX и способствует его конформационным изменениям во время гибели клетки [3, 6]. Поэтому мы поставили своей целью изучить ось BIF-1-BAX axis в нашей группе больных меланомой. Используя антитела, чувствительные к конформации белка BAX и распознающие его активированную форму, мы выявили соответствующее снижение уровня активной формы белка BAX, ассоциированное со снижением уровня белка BIF-1 в кусочках ткани из метастатической меланомы по сравнению с доброкачественными невусами. Более того, нами была обнаружена положительная корреляция между уровнем экспрессии белка BIF-1 и активной формой белка BAX в невусах, в которых был активирован митохондриальный апоптотический путь [16]. Напротив, эта корреляция не сохранялась в клетках меланомы, что позволяет предположить, что устойчивость к апоптозу, часто возникающая в опухолях меланомы, может быть, по крайней мере, частично, объяснена снижением экспрессии белка BIF-1.

Аутофагия и апоптоз представляют два ключевых внутриклеточных процесса, играющих роль в определении судьбы клетки, и они оказывают большое влияние на развитие и прогрессирование неоплазм [17]. Апоптоз является наиболее распространенной физиологической формой гибели клетки в отсутствие воспаления [18]. Внутренний путь апоптоза регулируется семейством белков BCL-2 и включает пермеабилизацию внешней митохондриальной мембраны (MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilization), которая приводит к высвобождению проапоптотических факторов, таких как цитохром *c* и SMAC/DIABLO, из митохондрий в ци-

тозоль. За MOMP следует процесс активации каскада каспаз, который приводит к гибели клетки [19]. В клетках здоровой ткани центральные проапоптотические регуляторы, белки BAX и BAK перемещаются между внешней митохондриальной мембраной (OMM – outer mitochondrial membrane) и цитозолем [20, 21]. В условиях апоптоза белки BAX и BAK активируются и подвергаются димеризации и сборке на OMM, в которой они образуют мультимерные поры [21]. Баланс взаимодействий между проапоптотическими и антиапоптотическими белками, такими как Bcl-2 или Bcl-XL, обеспечивает соответствующую регуляцию апоптоза в ответ на клеточные стрессы и другие факторы, запускающие процессы гибели клетки [19].

Было показано, что утрата экспрессии BAX является отрицательным прогностическим маркером отдельных типов опухолей, таких как рак молочной железы, яичников, поджелудочной железы и пищевода [22–25]. Кроме того, Fecker et al. недавно показали, что отсутствие экспрессии белка BAX в первичных поверхностно-распространяющихся меланомах ассоциирована с прогрессированием опухоли и снижением выживаемости больных [26]. Более того, снижение уровня экспрессии белка BAX в меланоме на стадии IIa ассоциировалось с повышенным риском развития метастазов и плохим прогнозом [27].

Представляет интерес, что белок Beclin-1 был идентифицирован в качестве взаимодействующего партнера белков Bcl-2, Bcl-XL и MCL-1. Такие взаимодействия могут регулировать перекрестные связи между апоптотическим и аутофагическим сигнальными путями [17]. Кроме участия в активации белка BAX, BIF-1 также образует комплекс с белком Beclin-1 через белок UVRAG и положительно регулирует процесс образования аутофагосом [7]. В настоящей работе было показано, что экспрессия Beclin- 1 в тканях меланомы понижена в сравнении с его экспрессией в ткани доброкачественных невусов. Кроме того, в дополнение к положительной корреляции между BIF-1 и BAX мы также наблюдали строгую корреляцию между экспрессией в меланоцитах белков BIF-1 и Beclin-1, которая не была обнаружена в тканях первичной и метастатической меланом. Более того, мы также наблюдали аналогичную картину корреляции между BIF-1 и маркером аутофагии – белком LC3B.

В ряде работ была отмечена роль аутофагии в подавлении роста опухолей. Ген *Beclin-1* был описан в качестве гена-супрессора опухолей, так как было обнаружено, что его аллель от 40% до 75% случаев рака молочной железы, яичников и простаты человека [28]. Кроме того, потеря аллеля гена *Beclin-1* у мышей приводила к повышенной встречаемости опухолей, таких как B-клеточная лимфома, гепатоцеллюлярная карцинома и аденокарцинома легких [29]. Связь между ролью белка Beclin-1 при меланоме была недавно описана в работе, в которой показано, что пониженная экспрессия белка Beclin-1 коррелирует с инвазивностью и снижением уровня выживаемости в течение 5 лет после проведения хирургической операции [30].

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что проксимальная регуляция, ответственная за координированную экспрессию BIF-1, Beclin-1 и BAX в меланоцитах, по-видимому, отсутствует в клетках первичной и метастатической меланомы. Вероятно, что пониженная экспрессия BIF-1, Beclin-1 и BAX и ожидаемый нефункционирующий проксимальный регуляторный механизм вносят вклад в развитие опухоли и устойчивость к действию лекарств в клетках меланомы.

Финансирование. Выполнение данной работы проходило при финансовой поддержке Швейцарского национального научного фонда (Swiss National Science Foundation, грант No. 310030_184816 был предоставлен H.U.S.) и Европейской программы науки и инноваций (European Union Horizon 2020 Research and Innovation Program; грант фонда Марии Склодовской No. 642295; MEL-PLEX). Изображения были получены на оборудовании, предоставленном Центром микроскопии университета г. Берн.

Вклад авторов. Ž.F. задумал, спланировал и осуществил работу, проанализировал и интерпретировал полученные результаты и написал текст статьи. S.M.S.J. провел эксперименты; R.E.H. осуществлял клинический уход за больными меланомой; H.U.S. осуществлял общее руководство работой, консультировал проведение экспериментов, обеспечил доступ к лабораторному оборудованию и редактировал статью; все авторы прочли и одобрили итоговый вариант статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Соответствие этическим нормам. Все процедуры, выполненные в настоящем исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитетов по этике и в соответствии с Хельсинкской декларацией от 1964 г. и её последующих изменений или со сравнимыми этическими стандартами. От каждого участника исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kjaerulff, O., Brodin, L., and Jung, A. (2011) The structure and function of endophilin proteins, *Cell Biochem. Biophys.*, **60**, 137-154, doi: 10.1007/s12013-010-9137-5.
2. Frangez, Z., Fernandez-Marrero, Y., Stojkov, D., Seyed Jafari, S. M., Hunger, R. E., Djonov, V., Riether, C., and Simon, H. U. (2020) BIF-1 inhibits both mitochondrial and glycolytic ATP production: its downregulation promotes melanoma growth, *Oncogene*, doi: 10.1038/s41388-020-1339-8.
3. Cuddeback, S. M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H. G. (2001) Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax, *J. Biol. Chem.*, **276**, 20559-20565, doi: 10.1074/jbc.M101527200.
4. Karbowski, M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. (2004) Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology, *J. Cell Biol.*, **166**, 1027-1039, doi: 10.1083/jcb.200407046.
5. Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., and De Camilli, P. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions, *J. Cell Biol.*, **155**, 193-200, doi: 10.1083/jcb.200107075.
6. Takahashi, Y., Karbowski, M., Yamaguchi, H., Kazi, A., Wu, J., Sebti, S. M., Youle, R. J., and Wang, H. G. (2005) Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9369-9382, doi: 10.1128/MCB.25.21.9369-9382.2005.
7. Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., et al. (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1142-1151, doi: 10.1038/ncb1634.
8. Kim, S. Y., Oh, Y. L., Kim, K. M., Jeong, E. G., Kim, M. S., Yoo, N. J., and Lee, S. H. (2008) Decreased expression of Bax-interacting factor-1 (Bif-1) in invasive urinary bladder and gallbladder cancers, *Pathology*, **40**, 553-557, doi: 10.1080/00313020802320440.
9. Coppola, D., Khalil, F., Eschrich, S. A., Boulware, D., Yeatman, T., and Wang, H. G. (2008) Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma, *Cancer*, **113**, 2665-2670, doi: 10.1002/cncr.23892.
10. Fan, R., Miao, Y., Shan, X., Qian, H., Song, C., Wu, G., Chen, Y., and Zha, W. (2012) Bif-1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and correlates with shortened patient survival, *Oncol. Lett.*, **3**, 851-854, doi: 10.3892/ol.2012.562.
11. Liu, H., He, Z., Bode, P., Moch, H., and Simon, H. U. (2018) Downregulation of autophagy-related proteins 1, 5, and 16 in testicular germ cell tumors parallels lowered LC3B and elevated p62 levels, suggesting reduced basal autophagy, *Front. Oncol.*, **8**, 366, doi: 10.3389/fonc.2018. 00366.
12. Liu, H., He, Z., von Rutte, T., Yousefi, S., Hunger, R. E., and Simon, H. U. (2013) Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 202ra123, doi: 10.1126/scitranslmed.3005864.
13. Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernandez, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., et al. (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 16878, doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
14. Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S. A. (2018) Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms, *Autophagy*, **14**, 207-215, doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.
15. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy, *Methods Mol. Biol.*, **445**, 77-88, doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
16. Sprecher, E., Bergman, R., Meilick, A., Kerner, H., Manov, L., Reiter, I., Shafer, Y., Maor, G., and Friedman-Birnbaum, R. (1999) Apoptosis, Fas and Fas-ligand expression in melanocytic tumors, *J. Cutan. Pathol.*, **26**, 72-77, doi: 10.1111/j.1600-0560.1999.tb01805.x.
17. Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., and Bhutia, S. K. (2014) Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, **19**, 555-566, doi: 10.1007/s10495-014-0967-2.
18. Nagata, S., and Tanaka, M. (2017) Programmed cell death and the immune system, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 333-340, doi: 10.1038/nri.2016.153.
19. Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 175-193, doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
20. Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., et al. (2015) Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak, *EMBO J.*, **34**, 67-80, doi: 10.15252/embj.201488806.
21. Tait, S. W., and Green, D. R. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 621-632, doi: 10.1038/nrm2952.
22. Guner, D., Sturm, I., Hemmati, P., Hermann, S., Hauptmann, S., Wurm, R., Budach, V., Dorken, B., Lorenz, M., and Daniel, P. T. (2003) Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis, *Int. J. Cancer*, **103**, 445-454, doi: 10.1002/ijc.10850.
23. Tai, Y. T., Lee, S., Niloff, E., Weisman, C., Strobel, T., and Cannistra, S. A. (1998) BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer, *J. Clin. Oncol.*, **16**, 2583-2590, doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2583.
24. Friess, H., Lu, Z., Graber, H. U., Zimmermann, A., Adler, G., Korc, M., Schmid, R. M., and Buchler, M. W. (1998) *bax*, but not *bcl-2*, influences the prognosis of human pancreatic cancer, *Gut*, **43**, 414-421, doi: 10.1136/gut.43.3.414.
25. Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V. M., Niskanen, E., Nordling, S., and Reed, J. C. (1995) Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma, *Cancer Res.*, **55**, 4471-4478.
26. Fecker, L. F., Geilen, C. C., Tchernev, G., Trefzer, U., Assaf, C., Kurbanov, B. M., Schwarz, C., Daniel, P. T., and Eberle, J. (2006) Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1366-1371, doi: 10.1038/sj.jid.5700192.
27. Tchernev, G., and Orfanos, C. E. (2007) Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings, *J. Cutan. Pathol.*, **34**, 247-256, doi: 10.1111/j.1600-0560.2006.00700.x.
28. Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature*, **402**, 672-676, doi: 10.1038/45257.
29. Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., et al. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene, *J. Clin. Invest.*, **112**, 1809-1820, doi: 10.1172/JCI20039.
30. Sivridis, E., Koukourakis, M. I., Mendrinos, S. E., Karpouzis, A., Fiska, A., Kouskoukis, C., and Giatromanolaki, A. (2011) Beclin-1 and LC3A expression in cutaneous malignant melanomas: a biphasic survival pattern for beclin-1, *Melanoma Res.*, **21**, 188-195, doi: 10.1097/CMR.0b013e328346612c.

LOSS OF CONCURRENT REGULATION OF THE EXPRESSION OF BIF-1, BAX AND Beclin-1 IN PRIMARY AND METASTATIC MELANOMA

Ž. Frangež[1], S. M. Seyed Jafari[2], R. E. Hunger[2], and H.-U. Simon[1,3*]

[1] *Institute of Pharmacology, University of Bern, Bern, Switzerland; E-mail: hus@pki.unibe.ch*

[2] *Department of Dermatology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland*

[3] *Department of Clinical Immunology and Allergology, Sechenov University, 119991 Moscow, Russia*

Received July 8, 2020
Revised July 8, 2020
Accepted July 12, 2020

Melanoma is one of the most aggressive and drug-resistant cancers. Despite novel promising therapeutic strategies, the prognosis of metastatic melanoma patients remains poor and it is often associated with high relapse rates. Endophilin B1, also known as BIF-1, is a multifunctional protein involved in several biological processes such as autophagy and apoptosis. BIF-1 promotes apoptosis through binding to BAX and its translocation to the mitochondrial outer membrane. On the other hand, BIF-1 can interact with Beclin-1 through UVRAG to promote autophagy. Several reports suggest an ambiguous role of BIF-1 in cancer development and progression. For example, it has been demonstrated that the expression of BIF-1 is reduced in both primary and metastatic melanoma and that the reduction of BIF-1 expression is associated with reduced overall survival of melanoma patients. Here we show that the expression of Beclin-1 and active form of BAX are also reduced in the melanoma patients. However, while we observed strong positive correlations between the expression of BIF-1 and Beclin-1 as well as between BIF-1 and BAX in benign nevi, these correlations were lost in the primary and metastatic melanoma cells. These data indicate disruption in the proximal molecular mechanisms which regulate expression of BIF-1, Beclin-1, and BAX in the primary and metastatic melanoma.

Keywords: apoptosis, autophagy, BAX, Beclin-1, BIF-1, melanoma

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1452 – 1463

УДК 577.12

ДЕГРАДАЦИЯ Mcl-1 В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРОИСХОДИТ НЕЗАВИСИМО ОТ АУТОФАГИИ

© 2020 Н.В. Первушин[1], В.В. Сеничкин[1], А.А. Капуста[1], А.С. Горбунова[1], В.О. Каминский[2], Б. Животовский[1,2], Г.С. Копеина[1]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lirroster@gmail.com*

[2] *Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, 17177 Стокгольм, Швеция*

Поступила в редакцию 10.07.2020
После доработки 07.08.2020
Принята к публикации 26.08.2020

В условиях недостатка питательных веществ в опухолевых клетках наблюдается деградация антиапоптотического белка Mcl-1, являющегося мишенью таргетной терапии онкологических заболеваний. При этом происходит усиление чувствительности злокачественных клеток к химиотерапевтическим препаратам. Показано, что ограничение питательных веществ (ОПВ) ведет к блокированию синтеза белка Mcl-1, однако механизмы деградации Mcl-1 в таких условиях остаются невыясненными. В данной работе исследовали вклад аутофагии и протеасомной деградации в регуляцию уровня Mcl-1 при недостатке питательных веществ. Установлено, что снижение уровня белка Mcl-1 в опухолевых клетках в указанных условиях не зависит от процесса макроаутофагии и происходит в результате его протеасомной деградации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, аутофагия, Mcl-1, недостаток питательных веществ, аденокарцинома.

DOI: 10.31857/S0320972520100115

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач современной медицины является борьба с онкологическими заболеваниями. По данным Всемирной организации здравоохранения, опухолевые заболевания ежегодно уносят жизни ~10 млн человек. Установлено, что одними из важнейших причин появления и роста опухолей являются мутации в генетическом материале клеток и последующее неконтролируемое деление перерожденных клеток. В процессе онкогенеза клетки способны приобретать устойчивость к различным типам программируемой клеточной гибели (ПКГ), включая апоптоз, который имеет большое значение в противоопухолевой защите организма [1, 2]. В регуляции апоптоза участвуют различные гены и их продукты, среди которых важную роль играют белки семейства Bcl-2, представленного как антиапоптотическими, так и проапоптотическими членами. Повышенная экспрессия антиапоптотических белков данного семейства (Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1) является одним из распространенных механизмов устойчивости опухолевых клеток к апоптозу. Среди антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 выделяется белок Mcl-1, который имеет ряд особенностей, отличающих его от других белков. Во-первых, Mcl-1 (37,2 кДа) по мол. массе превосходит такие антиапоптотические белки, как Bcl-2 и Bcl-xL (оба – 26 кДа), что связано с наличием большого *N*-концевого регуляторного участка, включающего в себя последовательности сигнала митохондриальной локализации и PEST (PEST-последовательности, богатые пролином, глутаминовой кислотой, серином и треонином, присущи белкам, подверженным быстрой дегра-

Принятые сокращения: Atg proteins – семейство белков, участвующих в процессе макроаутофагии; Bcl-2 – белок В-клеточной лейкемии/лимфомы-2; ECL – усиливающий хемилюминесценцию субстрат, содержащий люминол; ERK – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; FACS – сортировка клеток с активированной флуоресценцией; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; HBSS – среда, обедненная питательными веществами; Hsp – белки теплового шока; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; Mcl-1 – белок лейкемии миелоидных клеток-1; mTORC1 – комплекс 1, содержащий мишень рапамицина млекопитающих; PARP – поли(ADP-рибозо)-полимераза; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PBS – фосфатный солевой буфер; PEST-последовательности – последовательности, богатые пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T); PMSF – фенилметилсульфонилфторид; SD – депривация сыворотки; SDS – додецил сульфат натрия; Ub – убиквитин; USP9X – деубиквитиназа, убиквитин-специфичная пептидаза 9; ЙП – йодид пропидия; ОПВ – ограничение питательных веществ; ПААГ – полиакриламидный гель; ПКГ – программируемая клеточная гибель.

* Адресат для корреспонденции.

дации), что, в свою очередь, обуславливает короткое время полужизни данного белка [3]. Во-вторых, Mcl-1 способен быстро деградировать в результате действия различных стрессовых стимулов [4]. Кроме того, как и другие антиапоптотические белки семейства Bcl-2, Mcl-1 является необходимым фактором для выживания различных типов клеток и может быть рассмотрен в качестве возможной мишени таргетной терапии онкологических заболеваний [5–7].

Несколькими исследовательскими группами (включая нашу) было показано, что антиапоптотический белок Mcl-1 подвержен деградации в условиях ограничения питательных веществ (ОПВ) [8–10]. Однако механизмы этого процесса в настоящее время недостаточно изучены. Так как ОПВ является одним из основных стимулов активации аутофагии, можно предположить, что снижение уровня Mcl-1 в раковых клетках в условиях недостатка питательных веществ происходит по этому механизму, представляющему собой высококонсервативный процесс катаболизма различных клеточных компонентов в аутолизосомах.

Аутофагия является не только одним из типов ПКГ, но и важным адаптационным механизмом, поскольку она отвечает за утилизацию поврежденных органелл и белков [11]. В зависимости от механизмов доставки компонентов клеток к лизосомам различают несколько типов аутофагии, такие как шаперон-зависимую аутофагию, микроаутофагию и макроаутофагию. В случае микроаутофагии транспорт макромолекул и фрагментов мембран клеток в лизосому обеспечивается путем инвагинации ее мембраны. Этот тип часто наблюдается у дрожжевых микроорганизмов, но редко встречается у млекопитающих [12]. В случае макроаутофагии происходит образование аутофагосом, представляющих собой двухмембранные структуры, которые изолируют цитоплазматические компоненты, подлежащие деградации. Далее аутофагосомы сливаются с лизосомами, что ведет к образованию аутофаголизосом, в которых содержимое аутофагосом подвергается расщеплению. Контроль макроаутофагии, которая включает в себя процессы деградации рибосом, эндоплазматического ретикулума, митохондрий и других органелл, а также нуклеиновых кислот, липидов, белков, обеспечивается специфическими белками семейства Atg [13]. Данный вид аутофагии является наиболее изученным в настоящее время, поэтому в дальнейшем термин «аутофагия» будет использоваться для обозначения макроаутофагии. Наконец, существует шаперон-зависимая аутофагия, для которой не требуется формирования везикул. Этот тип аутофагии осуществляется при участии белков-шаперонов цитоплазмы семейства Hsp-70 и различных вспомогательных белков, регулирующих направленный транспорт частично денатурировавших белков из цитоплазмы в полость лизосомы для последующей деградации [14].

Как было отмечено выше, основным стимулом к активации аутофагии наряду с поврежденными органеллами или денатурировавшими белками является недостаток питательных веществ. В этой работе нами были использованы два экспериментальных подхода для создания условий ОПВ: культивирование клеток в бессывороточной среде (условия SD) и среде HBSS.

Первый подход представляет собой условия депривации сыворотки (SD). Удаление сыворотки из культуральной среды может приводить к различным биохимическим и молекулярным изменениям в раковых клетках, поскольку сыворотка содержит не только питательные вещества (белки, витамины, жирные кислоты и т.д.), но и факторы роста, которые стимулируют молекулярные каскады, регулирующие клеточный рост и пролиферацию – PI3K/Akt/mTORC1 и Ras/Raf/MAPK [15, 16]. Снижение доступности питательных веществ стимулирует процессы аутофагии напрямую, в то время как уменьшение стимуляции каскадов PI3K/Akt/mTORC1 и Ras/Raf/MAPK ведет к ослаблению антиапоптотической защиты раковых клеток и подавлению метаболических процессов, способствуя активации процессов аутофагии [17].

Второй экспериментальной моделью условий ОПВ является культивирование клеток в среде HBSS, которая является более сильным стимулом активации аутофагии по сравнению с условиями SD, так как в случае HBSS клетки культивируются в водно-солевом растворе, содержащем D-глюкозу, и полностью лишены не только сыворотки, что достигается при использовании модели SD, но и всех аминокислот [18].

Необходимо подчеркнуть, что процессы аутофагии и апоптоза находятся в тесной взаимосвязи. Так, например, антиапоптотические белки, в том числе и Mcl-1, препятствуют не только апоптозу, но и аутофагическим процессам за счет нейтрализации белка Beclin-1, который способствует протеканию аутофагии [19]. Кроме того, Mcl-1 может не только взаимодействовать с Beclin-1, но и вести к уменьшению его уровня, что происходит в результате конкуренции между Mcl-1 и Beclin-1 за связывание с деубиквитиназой USP9X, препятствующей протеасомной деградации обоих белков [20]. Таким образом, уменьшение концентрации Mcl-1 может стимулировать аутофагию, однако клеточный ответ (апоптотический или аутофагический) в резуль-

тате снижения уровня Mcl-1 будет определяться балансом апоптотических (про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2) и аутофагических (Atg-белки) факторов. Наконец, аутофагия играет двойственную роль в развитии опухолевых заболеваний. С одной стороны, она может стимулировать клеточную гибель, регулируя деградацию про- и антиапоптотических факторов (например, белков семейства Bcl-2 [21]). С другой стороны, данный процесс позволяет адаптироваться клеткам к стрессовым условиям, так как повышает выработку энергии и удаляет поврежденные органеллы.

Другим возможным механизмом снижения уровня антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях ОПВ могут являться процессы протеасомной деградации. В ряде работ была показана значимость этого механизма для Mcl-1, что детально рассмотрено в работе [6]. Убиквитинирование Mcl-1 и его последующая деградация в протеасомах в ответ на действие различных стимулов определяет короткое время жизни данного белка [6]. Стоит отметить, что степень убиквитинирования Mcl-1, как и других белков, контролируется балансом активностей убиквитинлигаз (Mule, Parkin, Trim17 и др.) и деубиквитиназ (USP9X, USP13, Ku70 и др.), что наглядно демонстрирует тесную взаимосвязь процессов апоптоза и протеасомной деградации [6].

Убиквитинлигазы обеспечивают деградацию своих субстратов за счет присоединения остатков убиквитина. Деубиквитиназы, напротив, повышают стабильность белков, противодействуя работе убиквитинлигаз. Первой убиквитинлигазой, для которой была обнаружена способность регуляции Mcl-1, была Mule. Интересно, что Mule способна избирательно контролировать уровень Mcl-1, не взаимодействуя с антиапоптотическими белками Bcl-xL или Bcl-2. Также в качестве убиквитинлигазы Mcl-1 был отмечен белок Parkin, участвующий в процессах митофагии (селективное разрушение митохондрий путем аутофагии). Убиквитинлигаза Trim17 и деубиквитиназа USP9X регулируют деградацию Mcl-1 после его фосфорилирования. Наконец, к деубиквитиназам Mcl-1 относится белок Ku70, участвующий в репарации ДНК [6].

Ранее нами было показано, что ингибирование протеасомной деградации в клетках аденокарциномы яичника Caov-4 и аденокарциномы шейки матки HeLa, культивируемых как в стандартных условиях, так и при ОПВ, приводило к стабилизации Mcl-1 [8]. Однако не была исследована роль процессов аутофагии в регуляции уровня Mcl-1 в условиях ОПВ.

Целью настоящей работы являлась оценка вклада аутофагии в уменьшение уровня антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ в опухолевых клетках. В качестве экспериментальной модели были использованы клетки трех раковых линий человека – аденокарциномы яичника Caov-4, шейки матки HeLa и легкого U1810. Для индукции апоптотической гибели применяли химиотерапевтический ДНК-повреждающий агент цисплатин, который используют для лечения этих типов рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследования были проведены на культурах клеток линий аденокарциномы яичника Caov-4, шейки матки HeLa и легкого U1810 (клетки дикого типа и нокаутные по аутофагии – U1810 ATG13KO). Клетки выращивали в CO_2-инкубаторе (5%-ная CO_2) при 37°C в среде DMEM («Gibco», США) или RPMI («Gibco»), содержащей 10%-ную телячью сыворотку («Gibco») и 5 мл раствора пирувата натрия с исходной концентрацией 11 мг/мл («ПанЭко», Россия) в присутствии антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, 100 ед/мл). Для экспериментов были взяты клетки в логарифмической фазе роста.

Экспериментальная модель ОПВ. Условия ограничения питательных веществ создавали с помощью двух моделей: 1) условия SD: культивирование клеток в среде DMEM и RPMI в присутствии только антибиотиков без добавления телячьей сыворотки и пирувата; 2) условия HBSS: культивирование клеток в водно-солевом растворе, в котором присутствовала D-глюкоза, но отсутствовали аминокислоты и сыворотка.

Реагенты. В экспериментах были использованы индуктор клеточной гибели цисплатин («ТЕВА», Израиль) в концентрации 70 мкМ, ингибитор аутофагии Бафиломицин A1 («Sigma», США) в концентрации 50 нМ, ингибитор протеасом MG-132 («Sigma») в концентрации 10 мкМ и селективный антагонист белка Mcl-1 S63845 («Active Biochem», Китай) в указанных в эксперименте концентрациях.

FACS-анализ. После культивирования клеток в условиях, указанных в описании эксперимента, клетки отделяли от культурального пластика с помощью 0,25%-ного трипсина («Gibco») и переносили в кондиционированную среду. Затем клетки центрифугировали (200–300 g, 5 мин, 4°C), дважды промывали холодным раствором PBS («ПанЭко») и осадок ресуспендировали в PBS (100 мкл на 1 млн клеток). ~100 тыс. клеток (10 мкл) переносили в 200 мкл 1x аннексин-связывающего буфера («BD Biosciences»,

США), и анализ популяции клеток проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II («BD Biosciences») и программного обеспечения («BD FACSDiva», США), как описано ранее [8].

Гель-электрофорез белков в ПААГ в присутствии SDS и Вестерн-блот-анализ. Клеточный осадок ресуспендировали в 50 ± 25 мкл RIPA-буфера (50 мМ Tris HCl, pH 7,4, 137 мМ NaCl, 0,1%-ный SDS, 0,5%-ный дезоксихолат, 1%-ный Triton X-100, 0,01%-ный PMSF, коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария)) и инкубировали на льду в течение 20 мин. После центрифугирования (16 000 g, 15 мин, 4°C) часть супернатанта была взята для определения количества белка в лизатах с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США). Другую часть супернатанта использовали для Вестерн-блот-анализа, как описано ранее [8]. В экспериментах были использованы первичные антитела к следующим белкам: PARP («Abcam», ab74290, Великобритания), p62 («Abcam», ab56416), LC3B («Abcam», ab51520), Mcl-1 («Cell Signaling», США), K48-Ub («Cell Signaling», #4289S), total Ub («Cell Signaling», #3933), тубулин-альфа («Abcam», ab4074, Великобритания), GAPDH («Cell Signaling, #2118). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, к кроличьему или мышиному IgG («Abcam», ab97200 и ab97046 соответственно). Разведения антител были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Обработку результатов измерений концентрации белка, клеточной гибели (FACS-анализ), а также статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Депривация сыворотки ведет к усилению процессов аутофагии в раковых клетках независимо от присутствия цисплатина. Согласно литературным данным, удаление факторов роста и питательных веществ из среды может приводить к усилению процессов аутофагии [22, 23]. Для оценки потенциальной роли аутофагии в деградации белка Mcl-1 был проведен анализ уровня аутофагии при использовании цисплатина как в стандартной, так и бессывороточной средах.

Для определения интенсивности процессов аутофагии в выбранной экспериментальной модели исследовали уровень маркера аутофагии белка LC3 в клетках линий Caov-4 и HeLa во всех анализируемых группах. Стимулирование аутофагии приводит к конъюгации LC3-I с фосфатидилэтаноламином и появлению активной формы LC3-II, которая обладает большей электрофоретической подвижностью и детектируется в геле ниже, чем LC3-I [24]. Таким образом, повышение соотношения LC3-II/ LC3-I, как правило, свидетельствует об усилении в клетке процессов аутофагии [25].

Для анализа уровня аутофагии клетки Caov-4 и HeLa инкубировали в стандартной среде или в условиях SD с добавлением цисплатина или без него в течение 2, 6, 12 или 18 ч, в качестве контроля использовали инкубацию клеток в течение 2 ч в стандартной среде.

Вестерн-блот-анализ показал, что в условиях SD происходило накопление LC3-II, что свидетельствует о выраженном усилении аутофагии уже спустя 2 ч культивирования вне зависимости от присутствия цисплатина (рис. 1, *а*). По мере протекания процессов аутофагии в клетках может наблюдаться снижение уровня LC3-II за счет интенсивной деградации этого белка. Данный феномен широко известен из научной литературы, поэтому для корректной оценки интенсивности аутофагии рекомендуют использовать ингибиторы протеаз или проводить оценку уровня LC3-II в различные временные точки [24]. Последний подход был применен в рамках настоящей работы, и выраженное накопление LC3-II в ранние часы инкубации позволило сделать вывод об интенсификации процессов аутофагии в условиях SD.

Обработка клеток цисплатином может приводить к накоплению активных форм кислорода (АФК) и, соответственно, повреждениям клеточных органелл [26]. В таких условиях в клетке будут дополнительно стимулироваться процессы аутофагии для удаления поврежденных структур и поддержания жизнеспособности. Поэтому уровень маркеров аутофагии был также проанализирован в клетках обеих линий, инкубированных в присутствии цисплатина в стандартной или бессывороточной среде. Показано, что добавление цисплатина не влияло значительным образом на перераспределение двух форм LC3 в течение 18 ч после начала инкубации (рис. 1, *а*). Некоторое снижение уровня LC3-II в сравнении с культивированием клеток Caov-4 и HeLa в условиях SD может быть следствием взаимного влияния между апоптозом и аутофагией. Как было замечено ранее, запуск апоптоза может препятствовать протеканию аутофагии, а подавление аутофагии может усиливать апоптотический ответ клеток [19].

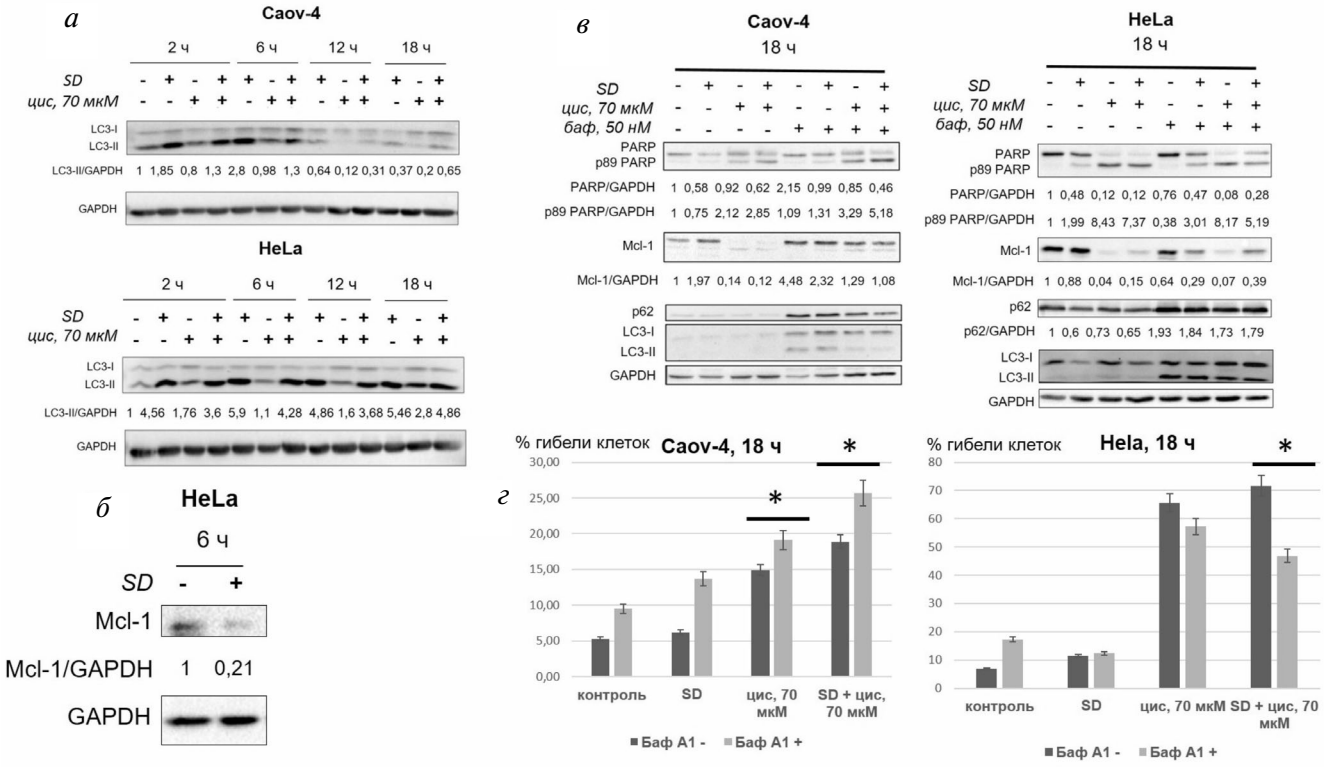


Рис. 1. *а* – Анализ индукции аутофагии в клетках Caov-4 и HeLa в условиях ОПВ; *б* – анализ изменений уровня Mcl-1 в условиях ОПВ в клетках HeLa; *в* – анализ изменений уровня Mcl-1 и оценка клеточной гибели в клетках Caov-4 и HeLa при действии ингибитора аутофагии Бафиломицина A1 (50 нМ) методом Вестерн-блота ; *г* – оценка клеточной гибели в клетках Caov-4 и HeLa при действии ингибитора аутофагии Бафиломицина A1 (50 нМ) методом проточной цитофлуориметрии с окраской Аннексином V-FITC и йодидом пропидия; % гибели клеток – суммарный % популяции Аннексин/ЙП +/–, Аннексин/ЙП +/+ и Аннексин/ЙП –/+ клеток. SD – депривация сыворотки; цис, 70 мкМ – 70 мкМ цисплатина; ч – часы инкубации; баф, 50 нМ – 50 нМ ингибитора аутофагии Бафиломицина; LC3I и LC3II – нелипидированная и липидированная формы LC3 соответственно; GAPDH – белковый маркер загрузки геля. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $n = 3$; * $p < 0,05$ (*U*-тест)

Ингибирование аутофагии оказывает разнонаправленный эффект на выживаемость раковых клеток. Как отмечено выше, в процессе аутофагии происходит деградация различных белков. По данным Вестерн-блот-анализа было выявлено, что в клетках Caov-4 и HeLa обработка цисплатином приводила к выраженному падению Mcl-1 как в нормальной, так и в бессывороточной среде (рис. 1, *в*).

Примечательно, что в выбранных временных рамках (18 ч инкубации) использование бессывороточной среды без добавления цисплатина по сравнению со стандартными условиями культивации приводило к незначительному понижению уровня Mcl-1 в клетках HeLa и даже к некоторому повышению уровня этого белка в клетках Caov-4, в то время как более короткий интервал инкубации (6 ч) в условиях SD на этих клеточных линиях вел к понижению уровня Mcl-1, которое было особенно выражено в клетках HeLa (рис. 1, *б*). Данный феномен был описан нами ранее [8]. Это обстоятельство демонстрирует уникальность условий SD, биологические эффекты которых зависят как от типа клеточных линий, так и от времени культивирования [16].

Также была проведена оценка влияния ингибиторов аутофагии на уровень антиапоптотического белка Mcl-1. С этой целью клетки Caov-4 и HeLa были предварительно обработаны ингибитором аутофагии Бафиломицином A1 (ингибитор H(+)-АТФазы вакуолярного типа, который влияет на слияние аутофагосом с лизосомами) в концентрации 50 нМ, после чего клеточную гибель индуцировали 70 мкМ цисплатина в стандартной или бессывороточной средах в течение 18 ч. Как уже было упомянуто ранее, об эффективности ингибирования аутофагии судили по накоплению форм LC3-I и LC3-II, а также по уровню белка p62, который отвечает за доставку убиквитинилированных белков в аутофагосомы.

Вестерн-блот-анализ показал, что действие Бафиломицина A1 ведет к стабилизации Mcl-1 в

зависимости от способа обработки и типа клеток. Так, в клетках Caov-4 Бафиломицин A1 вел к стабилизации Mcl-1 в клетках, обработанных цисплатином, как в стандартной, так и в бессывороточной средах. В клетках HeLa стабилизирующий эффект Бафиломицина A1 на Mcl-1 наблюдался только при обработке цисплатином в условиях SD (рис. 1, *в*).

Клеточная гибель регистрировалась по появлению одного из маркеров апоптоза – фрагмента p89 белка PARP (поли(АДР-рибозо)-полимераза). PARP участвует в процессе репарации повреждений ДНК. Расщепление PARP эффекторными каспазами ведет к его инактивации и свидетельствует об интенсивности протекания процессов апоптоза в клетке [27]. Стоит отметить, что добавление Бафиломицина A1 снижало протеолиз PARP и накопление его фрагмента p89 после обработки клеток HeLa цисплатином в условиях SD, что свидетельствовало об уменьшении уровня клеточной гибели, в то время как в клетках Caov-4 аналогичные условия вели к увеличению гибели клеток (рис. 1, *в*).

С целью количественной оценки влияния ингибирования аутофагии посредством Бафиломицина A1 на величину апоптотической популяции при действии цисплатина был проведен цитофлуориметрический анализ с окраской Аннексином V-FITC и йодидом пропидия клеток Caov-4 и HeLa, обработанных Бафиломицином A1 в конечной концентрации 50 нМ. Время инкубации обеих клеточных линий с цисплатином составляло 18 ч. Показано, что в клетках Caov-4 при действии цисплатина независимо от среды культивирования Бафиломицин A1 ведет к небольшому увеличению популяции гибнущих клеток (т.е. клеток, которые прокрашивались Аннексином V-FITC и/или йодидом пропидия). В то же время в клетках HeLa Бафиломицин A1 приводил к выраженному снижению (свыше 20% от общего числа клеток в популяции) клеточной гибели при действии цисплатином в условиях SD, в то время как в стандартной среде эффект был минимален (рис. 1, *г*).

Ингибирование аутофагии может оказывать различный эффект на выживаемость опухолевых клеток, зависящий не только от типа клеток, но и от способа индукции клеточной гибели. Подобный результат согласуется с современными представлениями о роли аутофагии в ответе опухолевых клеток на различные химиотерапевтические соединения [28]. Поскольку ингибирование аутофагии затрагивает множество анти- и проапоптотических факторов, различающийся ответ клеток Caov-4 и HeLa на действие Бафиломицина A1 может быть вызван стабилизацией различных белков. Стоит отметить, что накопление Mcl-1 при ингибировании аутофагии в клетках HeLa, обработанных цисплатином в условиях SD, коррелирует со снижением клеточной гибели. Следовательно, Mcl-1 может представляться одним из факторов, который отвечает за наблюдаемый феномен. Так, ингибирование Mcl-1 с помощью BH3-миметика S63845 приводило к более высокому уровню гибели клеток линии HeLa по сравнению с клетками Caov-4, что говорило о зависимости жизнеспособности клеток HeLa от этого белка [Рис. S1 в приложении этой статьи на сайте журнала (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya) и сайте Springer (Link.springer.com)].

Снижение уровня Mcl-1 в клетках U1810 наблюдается в условиях HBSS, но не в условиях SD. С целью анализа процессов аутофагии в нашей лаборатории была создана мутантная линия клеток аденокарциномы легкого U1810, нокаутных по гену *ATG13*, кодирующему одноименный белок, отвечающий за формирование фагосом [29]. Для дальнейшего изучения вклада аутофагии в уменьшение уровня белка Mcl-1 в раковых клетках использовали как данную нокаутную линию U1810 ATG13KO, так и клетки дикого типа U1810. В экспериментах использовали не только условия SD, но и вторую модель ОПВ – культивирование клеток в среде HBSS [18]. Для анализа уровня аутофагии клетки U1810 инкубировали в стандартной среде (среда RPMI), в условиях ОПВ в течение 2, 6, 12 или 18 ч, в качестве контроля клетки инкубировали в течение 2 ч в стандартной среде. Методом Вестерн-блот-анализа был оценен уровень белка Mcl-1, а также уровень маркеров аутофагии (белков LC3 и p62). Показано, что условия SD не влияли на уровень белка Mcl-1 в клетках U1810, в то время как культивация клеток в среде HBSS на более поздних временных точках (12 и 18 ч) приводила к снижению уровня Mcl-1 практически в 2 раза (рис. 2).

Важно отметить, что и условия SD, и условия HBSS приводили к эффективному запуску аутофагии, несмотря на различие уровней LC3-II в используемых экспериментальных моделях. Эту разницу можно объяснить тем, что при усилении уровня аутофагии деградация LC3-II может происходить быстрее преобразования формы LC3-I в LC3-II, что осложняет анализ изменения соотношения LC3-II/LC3-I в разных условиях. Такая деградация отражается в сниженном соотношении LC3-II/LC3-I и может быть неправильно интерпретирована [24, 30]. Тем не менее, в условиях HBSS наблюдалась более выраженная деградация белка p62, чем в условиях SD, что свидетельствует о высокой интенсивности процесса аутофагии.

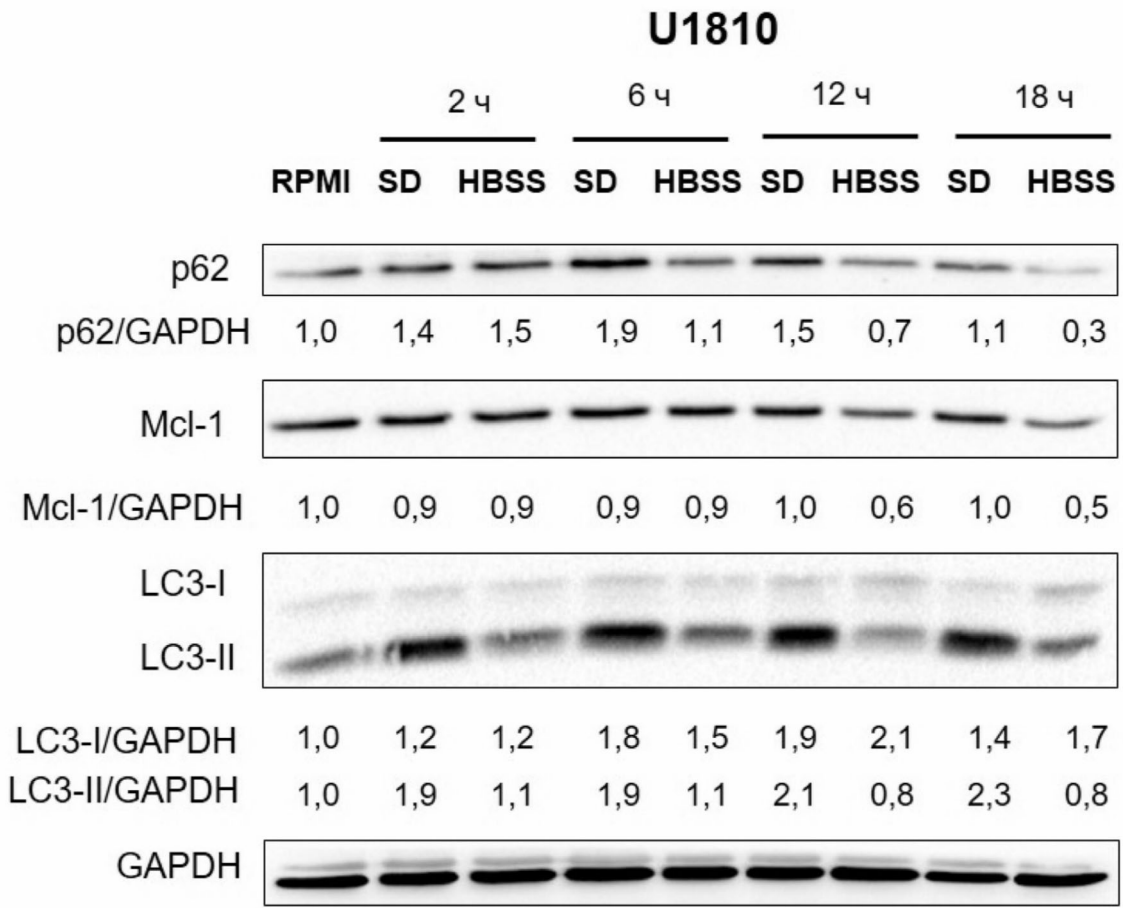


Рис. 2. Анализ индукции аутофагии и изменений уровня Mcl-1 в клетках U1810 в условиях ОПВ методом Вестерн-блота. SD (депривация сыворотки); HBSS – культуральная среда, обедненная питательными веществами; ч – часы инкубации; LC3-I и LC3-II – нелипидированная и липидированная формы LC3 соответственно; GAPDH – белковый маркер загрузки геля

Таким образом, более «жесткие» условия ОПВ, полученные с помощью культивирования клеток U1810 в среде HBSS, приводили к выраженной деградации белка Mcl-1, чего не наблюдалось в случае инкубирования в бессывороточной среде.

Снижение уровня Mcl-1 в клетках U1810 в условиях HBSS происходит как при генетическом нокауте Atg13, так и при ингибировании аутофагии с помощью Бафиломицина A1. Для выяснения причин деградации Mcl-1 в условиях, стимулирующих аутофагию, к клеткам U1810, растущим в стандартных условиях и среде HBSS, был добавлен ингибитор аутофагии Бафиломицин A1 в концентрации 50 нМ. Аналогичным образом были обработаны клетки U1810 ATG13KO, в которых нарушена возможность протекания процесса аутофагии. Клетки культивировали в указанных условиях в течение 18 ч. Методом Вестерн-блот-анализа был оценен уровень белка Mcl-1, а также уровень маркеров аутофагии (белков LC3 и p62). Показано, что снижение уровня Mcl-1 в условиях HBSS наблюдалось как в случае нокаутных по аутофагии клеток U1810 ATG13KO, так и при применении Бафиломицина A1 (рис. 3). Таким образом, суммируя полученные результаты, сделан вывод, что деградация Mcl-1, наблюдаемая в условиях ОПВ, не связана с процессами аутофагии.

Снижение уровня Mcl-1 в клетках U1810 в условиях HBSS происходит вследствие протеасомной деградации белков. Как было показано выше, деградация Mcl-1 при культивировании в среде HBSS происходила вне зависимости от процессов аутофагии. Вследствие этого было выдвинуто предположение, что потенциальной причиной снижения уровня данного антиапоптотического белка может стать усиление протеасомной деградации в условиях резкого ограничения питательных веществ. С этой целью к клеткам U1810, культивируемым в стандартных условиях или в среде HBSS, был добавлен ингибитор протеасом MG-132 в концентрации 10 мкМ за 2 ч до приготовления клеточных лизатов. Аналогичным образом были обработаны клетки U1810 ATG13KO, в которых нарушена

возможность протекания процессов аутофагии. Методом Вестерн-блот-анализа оценивали уровень белка Mcl-1, а также уровень маркеров протеасомной деградации белков (общего убиквитина и убиквитина K48 – цепи полиубиквитина, конъюгированные через остаток лизина K48). Было показано, что уровень короткоживущего белка Mcl-1 возрастал в несколько раз под действием ингибитора протеасом MG-132 в обеих линиях клеток при культивировании в стандартной среде, причем более выраженное увеличение Mcl-1 наблюдалось в клетках U1810 ATG13KO (рис. 4). Кроме того, в стандартных условиях роста уровень общего убиквитина и убиквитина K48 был выше в клетках U1810 ATG13KO по сравнению с клетками дикого типа. Данная разница увеличивалась при обработке клеток ингибитором протеасом MG-132, что свидетельствует о том, что в нокаутных по аутофагии клетках U1810 ATG13KO более интенсивно происходят процессы протеасомной деградации по сравнению с клетками U1810 при культивировании в стандартной среде. В условиях HBSS наблюдалось уменьшение стабилизации Mcl-1 в клетках U1810 при обработке MG-132, в то время как в аналогичных условиях в клетках U1810 ATG13KO – отсутствие этой стабилизации, что, по-видимому, связано с усилением гибели нокаутных по аутофагии клеток при культивировании в среде HBSS [31]. Более того, в условиях HBSS снижался уровень общего убиквитина и убиквитина K48, наибольшая разница с инкубацией в нормальной среде была детектирована при использовании ингибитора протеасом. Суммарно эти данные свидетельствуют о том, что выращивание клеток в среде HBSS ведет к торможению процессов протеасомной деградации, что согласуется с литературными данными [32]. Таким образом, было продемонстрировано, что в условиях недостатка питательных веществ деградация антиапоптотического белка Mcl-1 происходила по протеасомному пути (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе были изучены механизмы деградации антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ. С

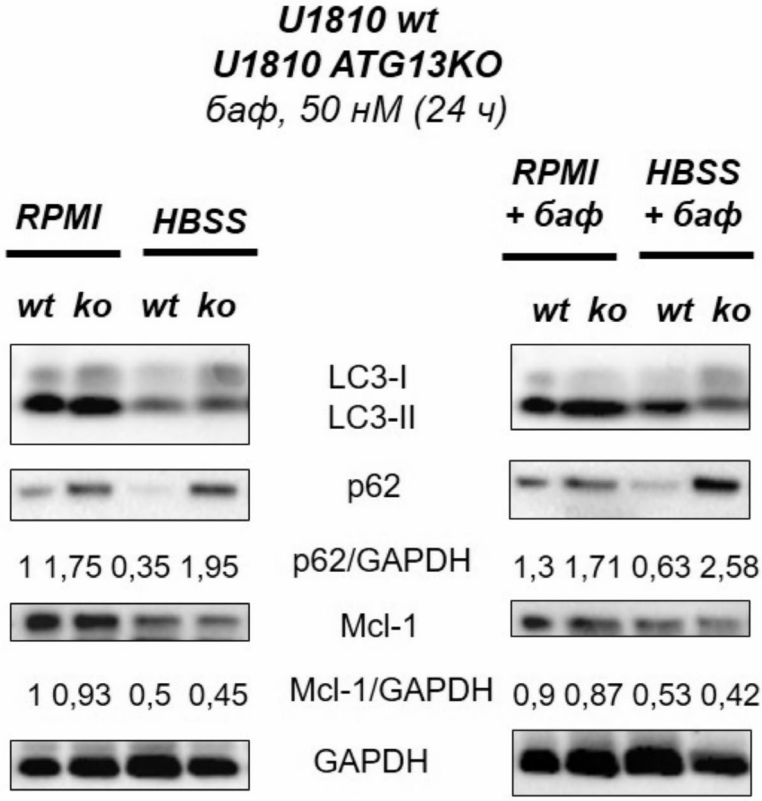


Рис. 3. Анализ индукции аутофагии и изменений уровня Mcl-1 в клетках U1810 и U1810 ATG13KO при действии ингибитора аутофагии Бафиломицина A1 (50 нМ) методом Вестерн-блота. Wt – клетки U1810; KO – клетки U1810 ATG13KO; баф, 50 нМ – 50 нМ ингибитора аутофагии Бафиломицина A1; HBSS – культуральная среда, обедненная питательными веществами; ч – часы инкубации; LC3-I и LC3-II – нелипидированная и липидированная формы LC3 соответственно; GAPDH – белковый маркер загрузки геля

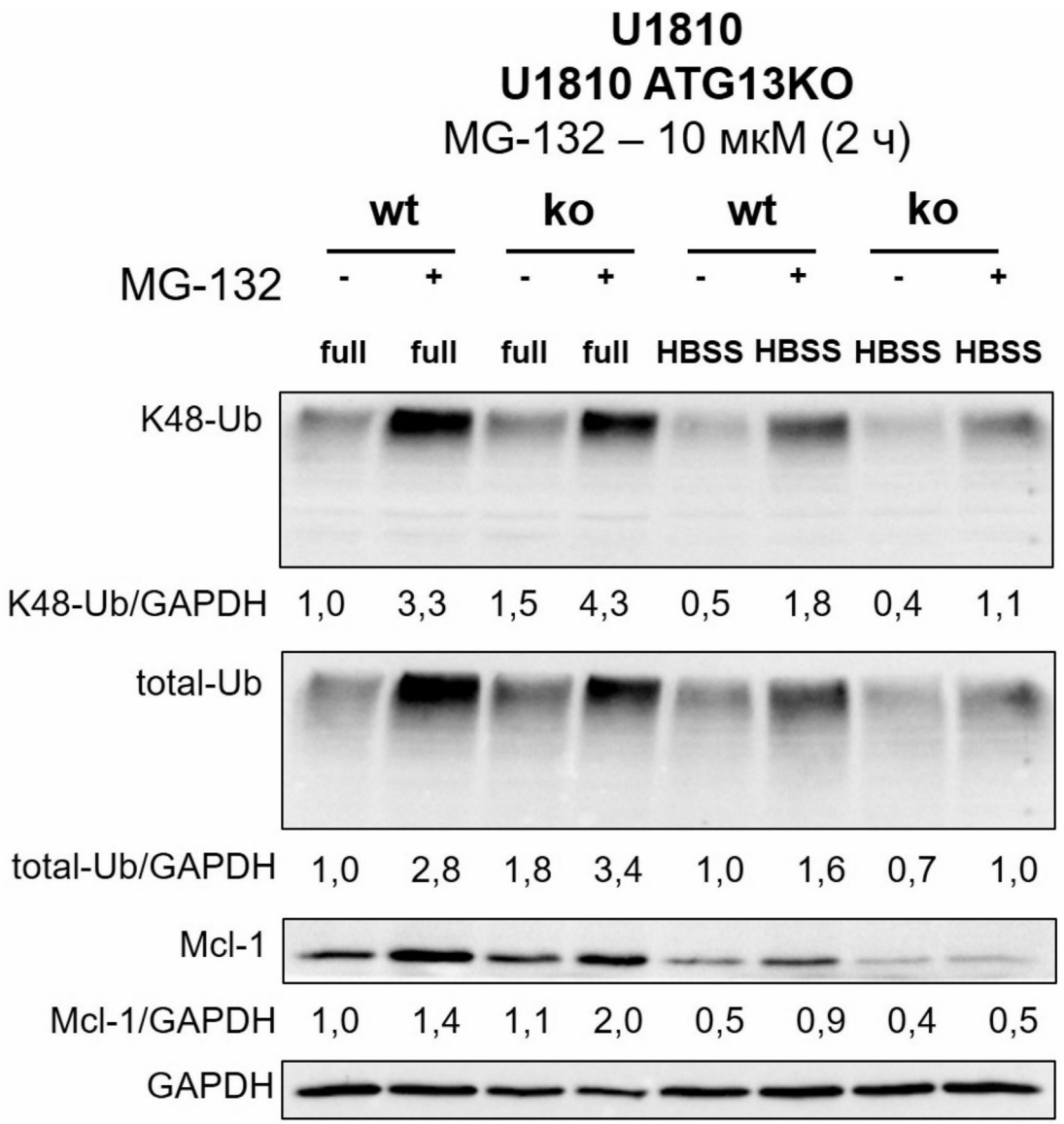


Рис. 4. Анализ изменений уровня Mcl-1 и количественной оценки убиквитинилирования в стандартных условиях и условиях ОПВ в клетках U1810 и U1810 ATG13KO методом Вестерн-блота. MG-132 – 10 мкМ ингибитора протеасом MG-132; HBSS – культуральная среда, обедненная питательными веществами; ч – часы инкубации; K48-Ub – цепи полиубиквитина, конъюгированные через остаток лизина K48; total Ub – общий убиквитин; GAPDH – белковый маркер загрузки геля

помощью двух экспериментальных моделей ОПВ (условия SD и культивирование в среде HBSS) было показано, что удаление факторов роста и питательных веществ из среды приводило к усилению процессов аутофагии в раковых клетках, что согласуется с литературными данными [22, 23]. Ранее нами было выявлено блокирование синтеза антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях ОПВ [8]. В настоящей работе показано, что в условиях SD цисплатин приводил к выраженному уменьшению уровня Mcl-1 в клетках Caov-4 и HeLa. Важно отметить, что отличительная особенность условий бессывороточного культивирования заключается в зависимости наблюдаемых биологических эффектов от типов клеточных линий и времени их инкубации [16]. Нами было показано, что длительное (18 ч) культивирование клеток в условиях ОПВ с использованием бессывороточной среды вело к слабому снижению уровня Mcl-1 в клетках HeLa или даже к незначительному повышению количества этого белка в клетках Caov-4 по сравнению со стандартными условиями. Однако кратковременное (6 ч) культивирование в условиях SD приводило к понижению уровня Mcl-1 в данных клеточных линиях, которое было особенно выражено для клеток HeLa [8]. Этот эффект может быть объяснен тем, что на поздних часах бессы-

вороточного культивирования клеток происходит реактивация сигнальных путей, например, ERK1/2 каскада, активность которого меняется волнообразно в условиях SD [16]. Показано, что ERK1/2 каскад регулирует уровень Mcl-1 посредством модуляции активности киназы PKC [33]. Данное обстоятельство может лежать в основе наблюдаемых колебаний уровня Mcl-1 в опухолевых клетках в условиях SD.

При сравнении двух экспериментальных моделей ОПВ на клетках U1810 было установлено, что более сильный стимулятор процессов аутофагии (среда HBSS) приводил к значительной деградации Mcl-1, которая не наблюдалась в условиях SD в данной линии клеток. Было предположено, что такой эффект обусловлен активацией процессов аутофагии. Однако использование нокаутных по аутофагии клеток U1810 ATG13KO или применение ингибитора аутофагии Бафиломицина A1 не предотвращало падения уровня Mcl-1, что свидетельствовало об ином механизме его деградации. Как нами было показано ранее, ингибирование протеасомной деградации увеличивало уровень Mcl-1 в клетках Caov-4 и HeLa независимо от условий культивирования (стандартных или при ОПВ) [8]. Настоящая работа подтверждает полученные ранее данные, показывая, что уровень Mcl-1 повышается при ингибировании протеасомной деградации с помощью MG-132.

Последующее изучение интенсивности процессов протеасомной деградации показало, что в условиях ОПВ происходило снижение активности протеасом. Однако, по-видимому, активности данной системы было достаточно для деградации короткоживущего белка Mcl-1. Данное обстоятельство можно объяснить тем, что клетки в условиях нехватки питательных веществ могут блокировать работу протеасом, переходя к процессу «протеафагии» с последующей элиминацией протеасом в аутофаго- или лизосомах. Данный механизм направлен на ослабление энергетически затратного процесса разрушения белков в условиях ОПВ [34]. При этом использование ингибитора протеасом приводило к стабилизации Mcl-1 в условиях ОПВ в клетках U1810, что говорит о протеасомо-зависимой деградации данного белка. Отсутствие стабилизации Mcl-1 в аналогичных условиях в клетках U1810 ATG13KO, вероятно, связано с тем, что наблюдаемое нами ранее торможение синтеза этого короткоживущего белка [8], а также запуск апоптотической гибели в нокаутных по аутофагии клетках [31] не дают возможности восстановить его внутриклеточный уровень. Необходимо отметить, что при усилении клеточной гибели антиапоптотический белок Mcl-1 подвергается каспаза-зависимому расщеплению [35-36], что препятствует его накоплению в клетках линии U1810 ATG13KO даже при действии MG-132.

Таким образом, полученные данные о механизме деградации Mcl-1 в условиях ОПВ могут внести вклад в понимание процессов жизнедеятельности опухолевых клеток и развитие новых терапевтических стратегий онкологических заболеваний. Так, в настоящее время активно исследуются возможности корректировки питания или использования химических миметиков ОПВ при лечении некоторых заболеваний [37]. Эффективность подобных подходов будет в том числе определяться балансом апоптотических и аутофагических факторов. Следовательно, короткоживущий антиапоптотический белок Mcl-1 может быть существенным прогностическим фактором для оценки успешности таких подходов в терапии.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 19-15-00125). Работа в лабораториях авторов также поддержана РФФИ (гранты 18-29-09005, 20-015-00500), Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) онкологическими фондами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 10, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jin, Z., and El-Deiry, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 139-163, doi: 10.4161/cbt.4.2.1508.
2. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science*, **234**, 364-368, doi: 10.1126/science.2876518.
4. Kale, J., Osterlund, E. J., and Andrews, D. W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance

towards death, *Cell Death Differ.*, **25**, 65-80, doi: 10.1038/cdd.2017.186.
5. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2019) Molecular comprehension of Mcl-1: from gene structure to cancer therapy, *Trends Cell Biol.*, **29**, 549-562, doi: 10.1016/j.tcb.2019.03.004.
6. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Gorbunova, A. S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation, *Cell Death Differ.*, **27**, 405-419, doi: 10.1038/s41418-019-0486-3.
7. Pervushin, N. V., Senichkin, V. V., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Mcl-1 as a "barrier" in cancer treatment: can we target it now? *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **351**, 23-55, doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.01.002.
8. Senichkin, V. V., Kopeina, G. S., Prokhorova, E. A., Zamaraev, A. V., Lavrik, I. N., and Zhivotovsky, B. (2018) Modulation of Mcl-1 transcription by serum deprivation sensitizes cancer cells to cisplatin, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 557-566, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.11.021.
9. Meynet, O., Zunino, B., Happo, L., Pradelli, L. A., Chiche, J., et al. (2013) Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice, *Blood*, **122**, 2402-2411, doi: 10.1182/blood-2013-01-478651.
10. Bhat, M., Yanagiya, A., Graber, T., Razumilava, N., Bronk, S., et al. (2017) Metformin requires 4E-BPs to induce apoptosis and repress translation of Mcl-1 in hepatocellular carcinoma cells, *Oncotarget*, **8**, 50542-50556, doi: 10.18632/oncotarget.10671.
11. Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function, *Genes Dev.*, **21**, 2861-2873, doi: 10.1101/gad.1599207.
12. Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R. J. (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum, *Autophagy*, **7**, 673-682, doi: 10.4161/auto.7.7.14733.
13. Klionsky, D. J., Baehrecke, E. H., Brumell, J. H., Chu, C. T., Codogno, P., et al. (2011) A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd Edn.), *Autophagy*, **7**, 1273-1294, doi: 10.4161/auto.7.11.17661.
14. Cuervo, A. M., and Wong, E. (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging, *Cell Res.*, **24**, 92-104, doi: 10.1038/cr.2013.153.
15. Levin, V. A., Panchabhai, S. C., Shen, L., Kornblau, S. M., Qiu, Y., and Baggerly, K. A. (2010) Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines, *J. Proteome Res.*, **9**, 179-191, doi: 10.1021/pr900392b.
16. Pirkmajer, S., and Chibalin, A. V. (2011) Serum starvation: caveat emptor, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **301**, 272-279, doi: 10.1152/ajpcell.00091.2011.
17. Green, D. R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014) Cell biology. Metabolic control of cell death, *Science*, **345**, 1250256, doi: 10.1126/science.1250256.
18. Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J. A., Abudu, Y. P., et al. (2018) Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy, *J. Cell Biol.*, **217**, 3640-3655, doi: 10.1083/jcb.201711002.
19. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., et al. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1, *EMBO J.*, **26**, 2527-2539, doi: 10.1038/sj.emboj.7601689.
20. Elgendy, M., Ciro, M., Abdel-Aziz, A. K., Belmonte, G., Zuffo, R. D., Mercurio, C., Miracco, C., Lanfrancone, L., Foiani, M., and Minucci, S. (2014) Beclin-1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner, *Nat. Commun.*, **5**, 5637, doi: 10.1038/ncomms6637.
21. Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L), *Autophagy*, **3**, 374-376, doi: 10.4161/auto.4237.
22. Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., and Zhu, W. G. (2010) Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 665-675, doi: 10.1038/ncb2069.
23. Steiger-Barraissoul, S., and Rami, A. (2009) Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons, *Apoptosis*, **14**, 1274-1288, doi: 10.1007/s10495-009-0396-9.
24. Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting, *Autophagy*, **3**, 542-545, doi: 10.4161/auto.4600.
25. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008) LC3 and autophagy, *Methods Mol. Biol.*, **445**, 77-88, doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
26. Kaminskyy, V. O., Piskunova, T., Zborovskaya, I. B., Tchevkina, E. M., and Zhivotovsky, B. (2012) Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation, *Autophagy*, **8**, 1032-1044, doi: 10.4161/auto.20123.
27. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature*, **371**, 346-347, doi: 10.1038/371346a0.
28. Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., and Pan, H. (2013) Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment, *Cell Death Dis.*, **4**, e838, doi: 10.1038/cddis.2013.350.
29. Mercer, C. A., Kaliappan, A., and Dennis, P. B. (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy, *Autophagy*, **5**, 649-662, doi: 10.4161/auto.5.5.8249.
30. Kaminskyy, V., Abdi, A., and Zhivotovsky, B. (2011) A quantitative assay for the monitoring of autophagosome accumulation in different phases of the cell cycle, *Autophagy*, **7**, 83-90, doi: 10.4161/auto.7.1.13893.
31. Allavena, G., Cuomo, F., Baumgartner, G., Bele, T., Sellgren, A., et al. (2018) Suppressed translation as a mechanism of initiation of CASP8 (caspase 8)-dependent apoptosis in autophagy-deficient NSCLC cells under nutrient limitation, *Autophagy*, **14**, 252-268, doi: 10.1080/15548627.2017.1405192.
32. Hoeller, D., and Dikic, I. (2016) How the proteasome is degraded, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13266-13268, doi: 10.1073/pnas.1616535113.
33. Pal, D., and Basu, A. (2017) Protein kinase C-eta regulates Mcl-1 level via ERK1, *Cell. Signal.*, **40**, 166-171, doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.012.
34. Marshall, R. S., and Vierstra, R. D. (2018) To save or degrade: balancing proteasome homeostasis to maximize cell survival, *Autophagy*, **14**, 2029-2031, doi: 10.1080/15548627.2018.1515531.
35. Ryu, Y. K., Hall, C. P., Patrick Reynolds, C., and Kang, M. H. (2014) Caspase-dependent Mcl-1 cleavage and effect of Mcl-1 phosphorylation in ABT-737-induced apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cell lines, *Exp. Biol. Med.*, **239**, 1390-1402, doi: 10.1177/1535370214538745.
36. Herrant, M., Jacquel, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2004) Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract

Bim-induced apoptosis, *Oncogene*, **23**, 7863-7873, doi: 10.1038/sj.onc.1208069.
37. Kopeina, G. S., Senichkin, V. V., and Zhivotovsky, B. (2017) Caloric restriction – a promising anti-cancer approach: from molecular mechanisms to clinical trials, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer,* **1867**, 29-41, doi: 10.1016/j.bbcan.2016.11.002.

NUTRIENT DEPRIVATION PROMOTES Mcl-1 DEGRADATION IN AN AUTOPHAGY-INDEPENDENT MANNER

N. V. Pervushin[1], V. V. Senichkin[1], A. A. Kapusta[1], A. S. Gorbunova[1], V.O. Kaminskyy[2], B. Zhivotovsky[1,2], and G. S. Kopeina[1]*

[1] *Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: lirroster@gmail.com*
[2] *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden*

Received July 10, 2020
Revised August 7, 2020
Accepted August 26, 2020

The antiapoptotic protein Mcl-1, which is an attractive target for cancer treatment, is degraded under nutrient deprivation conditions in different types of cancer. This process sensitizes cancer cells to chemotherapy. It has been found that nutrient deprivation leads to suppression of Mcl-1 synthesis; however, the mechanisms of Mcl-1 degradation under such conditions remain to be elucidated. In this study, we have investigated the contribution of autophagy and proteasomal degradation to the regulation of the level of Mcl-1 protein under nutrient deprivation conditions. We found that these circumstances cause a decrease in the level of Mcl-1 in cancer cells in a macroautophagy-independent manner via proteasomal degradation.

Keywords: apoptosis, autophagy, Mcl-1, nutrient deprivation, adenocarcinoma

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1464 – 1473

УДК 576.32/.36

BNIP3 КАК РЕГУЛЯТОР ЦИСПЛАТИН-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА

© 2020 А.С. Горбунова[1], Т.В. Денисенко[1], М.А. Япрынцева[1], А.Д. Пивнюк[1], Т.А. Приказчикова[2], В.Г. Гогвадзе[1,3], Б. Животовский[1,3]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: boris.zhivotovsky@ki.se*

[2] *Сколковский институт науки и техники, Центр наук о жизни, 121205 Москва, Россия*

[3] *Каролинский институт, Институт медицины окружающей среды, SE-171 77 Стокгольм, Швеция*

Поступила в редакцию 16.07.2020
После доработки 27.08.2020
Принята к публикации 28.08.2020

BNIP3 – белок семейства Bcl-2, участвующий в регуляции различных видов клеточной гибели, включая апоптоз и аутофагию. Однако его роль в этих процессах остается до конца не изученной и зависит от типа раковых клеток и факторов среды (pH, уровень O_2 и т.д.). В данной работе исследовали роль белка BNIP3 в регуляции апоптоза клеток аденокарциномы лёгкого. Показано, что подавление экспрессии BNIP3 приводит к угнетению клеточного дыхания и стимуляции продукции митохондриальных активных форм кислорода, что может потенциально повлиять на клеточную гибель. Обнаружено, что выход цитохрома *c* из митохондрий при индукции апоптоза цисплатином в клетках с нокаутом и нокдауном по BNIP3 был выше, чем в клетках дикого типа. Кроме того, снижение экспрессии BNIP3 приводило к увеличению активности каспазы-3 и, как следствие, накоплению маркера апоптоза – фрагмента p89 ПАРП при индукции цисплатином в сравнении с клетками дикого типа. Анализ накопления клеток во фракции SubG1 методом проточной цитофлуориметрии подтвердил усиление гибели клеток с нокаутом по BNIP3. Предварительная обработка антиоксидантом Тролоксом не влияла на гибель клеток, что свидетельствует о ее независимости от активных форм кислорода. Представленные данные указывают на то, что BNIP3, участвуя в контроле качества митохондрий, способен оказывать влияние на митохондриальный путь гибели клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: BNIP3, апоптоз, митофагия, аденокарцинома легкого, цисплатин.

DOI: 10.31857/S0320972520100127

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности людей в мире, уступая лишь сердечно-сосудистым, а в некоторых развитых странах занимают лидирующую позицию. Наиболее распространённой причиной такой смертности является рак лёгкого: ежегодно от него умирает более 1,5 млн человек. Важнейшей причиной развития рака лёгкого признаётся курение, однако самый распространённый тип – аденокарцинома лёгкого (АКЛ) – в большей степени, чем другие виды, ассоциирована с генетической предрасположенностью и воздействием внешних факторов среды [1]. Раскрытие механизмов функционирования и гибели опухолевых клеток на примере рака лёгкого является важной задачей при разработке новых терапевтических препаратов, в том числе таргетной терапии.

Злокачественные опухоли развиваются из-за перерождения нормальных клеток в результате мутаций, как усиливающих пролиферацию, так и подавляющих механизмы гибели клеток. В процессах клеточной гибели важную роль играет семейство белков Bcl-2, функционально разделяющееся на про- и антиапоптотические белки. Среди проапоптотических представителей Bcl-2 семейства структурно выделяют белки, имеющие один из четырех доменов, а именно BH3-домен, т.н. «BH3-only» белки, регулирующие активности как про-, так и антиапоптотических членов данного семейства [2]. Один из представителей подгруппы «BH3-only», BNIP3

Принятые сокращения: АКЛ – аденокарцинома лёгкого; ПАРП – поли(АДФ-рибоза)-полимераза; ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; КЦХФ – карбонилцианид-m-хлорфенилгидразон; СПК – скорость потребления кислорода; HRE – фактор, чувствительный к гипоксии (hypoxia responsible element); HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia inducible factor); siRNA – малые интерферирующие РНК (small interfering RNA); мтАФК – митохондриальные активные формы кислорода; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; wt – wild type (дикий тип).

* Адресат для корреспонденции.

(Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3) представляет собой белок с мол. массой 21,5 кДа и состоит из четырех основных доменов: PEST-домена на *N*-конце, атипичного BH3-домена, консервативного домена (CD) и трансмембранного домена (TM) на *C*-конце [3]. BH3-домен определяет способность BNIP3 связываться с комплексами Bcl-2/Beclin-1 и Bcl-X_L/ Beclin-1, что приводит к высвобождению Beclin-1 и стимуляции аутофагии [4]. Регуляция клеточной гибели обеспечивается *C*-концевым TM-доменом, которым белок прикрепляется к наружной мембране митохондрии [3]. Благодаря TM-домену BNIP3 способен взаимодействовать с Bcl-2 и Bcl-X_L, блокируя их антиапоптотическое действие [5]. Помимо этого, BNIP3 модулирует убиквитин- и рецептор-зависимую митофагию, а также способствует транслокации E3 убиквитинлигазы Parkin в митохондрии, тем самым запуская убиквитин-зависимый тип митофагии [6]. BNIP3 способен напрямую связываться с аутофагическим белком LC3 на мембранах фагофора, обеспечивая перемещение митохондрий внутрь аутофагосомы для последующей их деградации [7].

Развитие опухолей в организме зачастую проходит в условиях гипоксии. Промотор BNIP3 включает в себя чувствительный к гипоксии элемент (HRE), с которым связывается фактор, индуцируемый гипоксией 1 (HIF-1), что приводит к увеличению транскрипции мРНК и последующему накоплению BNIP3 [8]. Накопление BNIP3 приводит к активации аутофагии и адаптации клетки к гипоксическим условиям. Таким образом, BNIP3, регулируя клеточную гибель в условиях нехватки кислорода, является потенциально важным белком в процессе канцерогенеза.

Будучи «BH3-only» белком, BNIP3 способен проявлять проапоптотические функции. Однако в ряде случаев повышенная экспрессия BNIP3 коррелирует с более агрессивным фенотипом опухоли и негативным прогнозом для пациентов [8–11]. Вследствие этого его роль в онкогенезе до сих пор остается неясной и требует более детального изучения.

Цисплатин – один из препаратов, применяемых в послеоперационной химиотерапии рака легкого, представляет собой платиносодержащее соединение, повреждающее ДНК в результате взаимодействия с пуриновыми основаниями ДНК [12]. Возникновение устойчивости к цисплатину у опухолевых клеток является серьёзной медицинской проблемой, требующей активного поиска стратегий для ее решения.

В связи с этим целью настоящей работы стало исследование роли белка BNIP3 в апоптозе, вызванном цисплатином в клетках АКЛ. Полученные данные могут не только внести вклад в фундаментальные знания о механизмах клеточной гибели, но и способствовать разработке новых подходов к персонифицированной медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования и индукция гибели клеток. Клетки АКЛ человека линий A549 и H23, полученные из коллекции ATCC, культивировали в среде RPMI 1640 («Gibco», США), содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку (w/v) («Gibco»), 1%-ный пируват (w/v) («ПанЭко», Россия), пенициллин/стрептомицин (100 ед/мл), гидромицин B (100 мкг/мл) и генетицин (200 мкг/мл) («Gibco»), в атмосфере 5%-ной CO_2 при температуре 37°C. По достижении клетками 70% конфлюентности клеточную гибель индуцировали добавлением цисплатина («Тева», Израиль). В качестве антиоксиданта использовали водорастворимый аналог витамина E – Тролокс («Roche», Франция).

Вестерн-блот анализ. Контрольные и обработанные цисплатином клетки лизировали с помощью RIPA-буфера (25 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 1%-ный NP-40, 0,5%-ный дезоксихолат натрия), содержащего протеазный ингибитор («Roche», Франция). Полученные образцы смешивали с Лэммли-буфером и инкубировали при 95°C в течение 5 мин. Разделение белков осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили при 110 В в течение 110 мин, далее мембраны помещали в 5%-ный раствор обезжиренного молока, растворенного в буфере TBST (20 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0,1%-ный Tween 20, pH 7,4), на 45 мин при комнатной температуре для блокирования неспецифических сайтов связывания с белком. После этого мембраны отмывали в TBST (4 × 5 мин) и инкубировали с первичными антителами при 4°C ~16 ч. После этого мембрану отмывали в TBST (4 × 5 мин), добавляли раствор вторичных антител в 2,5%-ном обезжиренном молоке и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Мембрану отмывали (4 × 5 мин) в TBST, и детектировали сигнал с помощью ECL субстрата. Регистрация хемилюминесценции и анализ изображения проводили на приборе ChemiDocTM XRS+System («Bio-Rad», США). Концентрацию белков определяли с помощью BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США). В работе использовали следу-

ющие первичные антитела в указанном разведении: цитохром *c* 1 : 1000 (11940, «Cell Signaling», Нидерланды), ПАРП 1 : 1000 (7150, «Santa Cruz Biotechnology», США), p89-ПАРП 1 : 1000 (9541, «Cell Signaling»), BNIP3 1 : 1000 (44060, «Cell Signaling»), Винкулин 1 : 10 000 (129002, «Abcam», Великобритания), и 1 : 1000 ГАФДГ (5174, «Cell Signaling»). В экспериментах также применяли вторичные антитела против мышиных (ab205719, «Abcam») и кроличьих (ab205718, «Abcam») иммуноглобулинов в разведении 1:5000.

Создание клеточных линий с нокаутом и нокдауном по BNIP3. Для получения стабильной клеточной линии с нокаутом по BNIP3, клетки A549 и H23 трансфицировали вектором CRISPR/Cas9 KoBNIP3 Plasmid («Santa Cruz Biotechnology», США) с использованием липофектамина LTX («Thermo Fisher Scientific», США). Далее проводили отбор флуоресцирующих клонов, содержащих вектор CRISPR/Cas9 KoBNIP3, на сортере FACS Aria III (BD, США) и осуществляли их дальнейшее культивирование.

Для получения линии с нокдауном по BNIP3 клетки A549 и H23 трансфицировали малыми интерферирующими РНК (siRNA) (CUCGGUUUCUAUUUAUAAU) (100 нМ) с использованием липофектамина RNAiMAX («Thermo Fisher Scientific»). Качество нокаута и нокдауна по BNIP3 оценивали с помощью Вестерн-блот анализа.

Измерение интенсивности митохондриального дыхания. 12 000 клеток рассаживали на 96-луночный планшет («Seahorse Bioscience», США) в стандартной среде RPMI 1640, по достижении 70–80% конфлюентности клетки промывали, а затем инкубировали в среде Seahorse XF (25 мМ глюкозы, 2 мМ глутамина и 1 мМ пирувата натрия; pH 7,4) 1 ч при 37°C. Оценку скорости потребления кислорода (СПК) клетками в реальном времени проводили с помощью прибора Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer (США). В процессе оценки дыхания к клеткам добавляли последовательно 1,25 мкМ олигомицина, 1,25 мкМ карбонилцианид-m-хлорфенилгидразона (КЦХФ) и 1,25 мкМ ротенона/антимицина А, что позволяло оценить исходную скорость дыхания, связанного с синтезом АТФ, протонную проводимость мембраны и резервную емкости дыхательной цепи. Полученные данные были нормализованы в расчете на общее содержание белка в каждой лунке.

Получение цитозольной и митохондриальной фракций белков. Собранные с планшетов клетки после осаждения суспендировали в буфере для фракционирования (150 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ EGTA, 0,01%-ный дигитонин, 5 мМ Tris, pH 7,5) и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем пробы центрифугировали при 15 000 g 10 мин, что позволяло отделить цитозольную фракцию (надосадочная жидкость) от митохондриальной (осадок). Анализ белков из данных фракций проводили методом Вестерн-блот.

Измерение уровня митохондриальных активных форм кислорода. Продукцию митохондриальных активных форм кислорода в клетках оценивали с помощью красителя MitoSOX™ Red («Molecular Probes», США) с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II («BD», США), согласно инструкции производителя.

Оценка гибели клеток по размеру популяции SubG1. После осаждения клетки ресуспендировали в DPBS, добавляли холодный 70%-ный этанол по капле при непрерывном перемешивании, после чего инкубировали не менее 60 мин при температуре –20°C. Перед измерением клетки осаждали, ресуспендировали в DPBS, добавляли пропидий йодид (50 мкг/мл) и РНКазу А (100 мкг/мл), инкубировали 15 мин, затем анализировали на проточном цитометре FACS Canto II («BD»).

Измерение активности каспазы-3. Клетки после обработки осаждали центрифугированием и осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS; по 25 мкл переносили в три лунки 96-луночного планшета, оставшиеся 25 мкл использовали для измерения белка с помощью BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific») для последующей нормализации полученных значений каспазной активности. Далее добавляли к суспензии клеток 75 мкл буфера (100 мМ HEPES, 10%-ная сахароза, 0,1%-ный Chaps, 5 мМ DTT, 0,001%-ный NP-40), содержащего флуоресцентный субстрат (40 мкМ DEVD-AMC) для измерения активности каспазы-3. Флуоресценцию измеряли на приборе Varioskan Flash («Thermo Fisher Scientific»), длина волны поглощения – 380 нм, длина волны испускания – 460 нм. Измерения проводили в течение 30 мин с интервалом в 1 мин при 37°C.

Статистическая обработка данных. Эксперименты были выполнены в трех повторах, результаты представлены в виде среднего значения ± ± стандартное отклонение. Сравнение результатов проводили с использованием two-way ANOVA (* $p \le 0,05$, ** $p \le 0,01$, *** $p \le 0,001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение клеточных линий с нокаутом и нокдауном по BNIP3. Для изучения роли белка

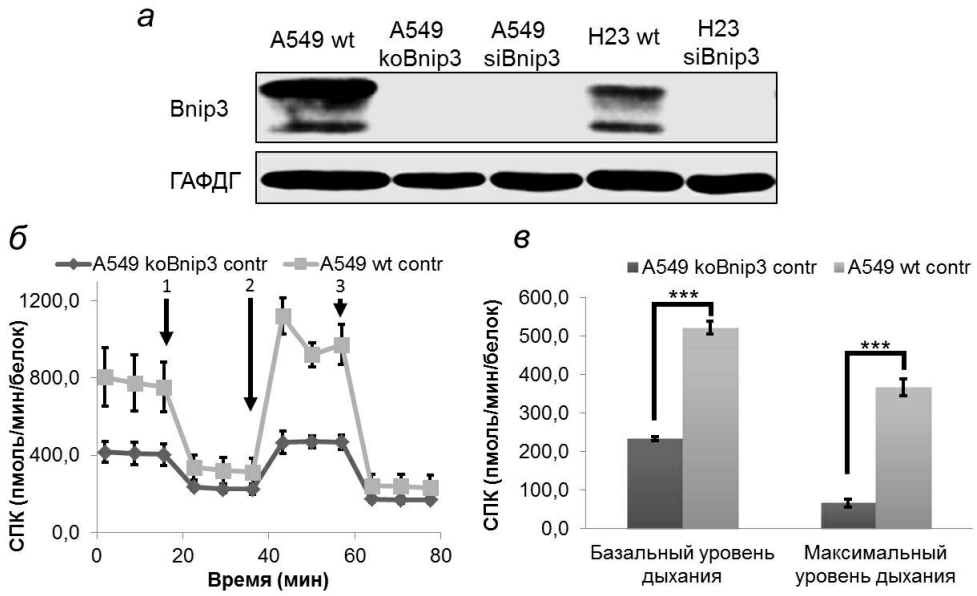


Рис. 1. *а* – Вестерн-блот анализ содержания белка BNIP3 в клетках дикого типа и дефицитных по гену *BNIP3*; *б* – оценка потребления кислорода клетками дикого типа и с дефицитом *BNIP3*. Инъекции олигомицина, КЦХФ и антимицина с ротеноном соответствуют стрелкам 1, 2 и 3 соответственно; *в* – гистограмма, отражающая максимальный (стимулируемый КЦХФ) и базальный уровни дыхания; СПК (пмоль/мин/мг белка) – скорость поглощения кислорода, нормализованная на общее содержание белка в пробе. Эксперименты были выполнены в трех повторах

BNIP3 в регуляции гибели клеток АКЛ были созданы линии клеток A549 и H23, в которых экспрессия BNIP3 была выключена с использованием методики CRISPR/Cas9. Для исключения неспецифических (off-target) эффектов CRISPR/Cas9 системы вследствие неспецифической активности эндонуклеазы Cas9 эксперименты также проводили с использованием таргетной к мРНК BNIP3 siRNA. Как показал анализ, оба метода приводили к значительному снижению содержания белка BNIP3 (рис. 1, *а*). BNIP3 на 56% гомологичен другому представителю семейства Bcl-2 – BNIP3L/NIX [13]. Однако применяемые нами методы нокаута и нокдауна BNIP3 не приводили к изменению уровня BNIP3L/NIX, что позволило направленно изучить вклад BNIP3 в процессы клеточной гибели.

Являясь адаптерным белком, обеспечивающим утилизацию поврежденных митохондрий в аутофагосоме, BNIP3 участвует в митофагии, контролируя качество митохондрий. Логично предположить, что подавление экспрессии BNIP3 может ослабить процесс митофагии и привести к появлению дефектных органелл, не способных адекватно обеспечивать энергией клетку. Для проверки этого предположения нами была проведена оценка функциональной активности митохондрий, в частности дыхания органелл с помощью прибора Seahorse Analyzer, позволяющего оценивать потребление кислорода митохондриями в клетке *in situ*. Выяснилось, что нокаут BNIP3 приводил к угнетению как базального (~ в 2,5 раза), так и максимально возможного, стимулируемого протонофором КЦХФ, дыхания (~ в 7 раз) (рис. 1, *б*, *в*). По всей вероятности, снижение потребления кислорода клетками после нокаута BNIP3 обусловлено не снижением содержания митохондрий в клетке, а угнетением митофагии, в результате чего поврежденные и слабодышащие, митохондрии не утилизируются, но вносят вклад в снижение дыхания клеток.

Влияние BNIP3 на выход цитохрома *c* из митохондрий при индукции цисплатином. Одним из основных событий митохондриального пути апоптоза является выход цитохрома *c* из межмембранного пространства органелл. Оказавшись в цитозоле, цитохром *c* принимает участие в создании комплекса апоптосомы, в которой происходит активация каспазного каскада [14]. Можно предположить, что в условиях подавления митофагии, вызванной снижением уровня BNIP3, появится популяция митохондрий более чувствительная к пермеабилизации внешней мембраны в условиях индукции апоптоза.

Оценку выхода цитохрома *c* при апоптозе, вызванном цисплатином (30 мкМ), исследовали в клетках A549 как дикого типа, так и с нокаутом (A549 KoBNIP3) и нокдауном (A549 siBNIP3) BNIP3. Результаты исследования показали, что выход цитохрома *c* из митохондрий в клетках с

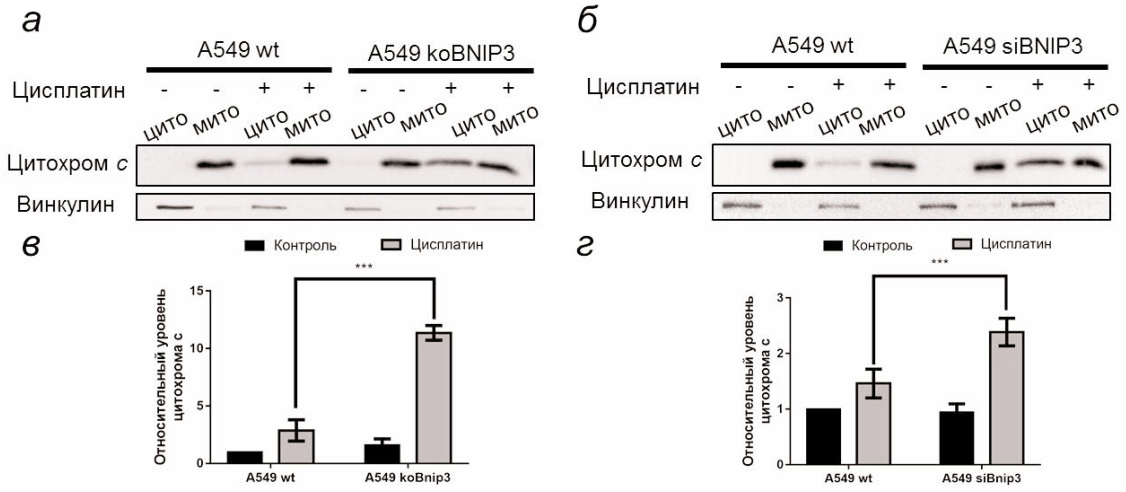


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ содержания цитохрома *c* в цитозольной (цито) и митохондриальной (мито) фракциях линий A549 wt и A549 KoBNIP3 (*а*), A549 wt и A549 siBNIP3 (*б*) спустя 24 ч после индукции апоптоза цисплатином, и их денситометрическая оценка (*в*, *г*). Винкулин использовали в качестве контроля загрузки белка, относительно которого рассчитывали уровень цитохрома *c*. Эксперименты были выполнены в трех повторах

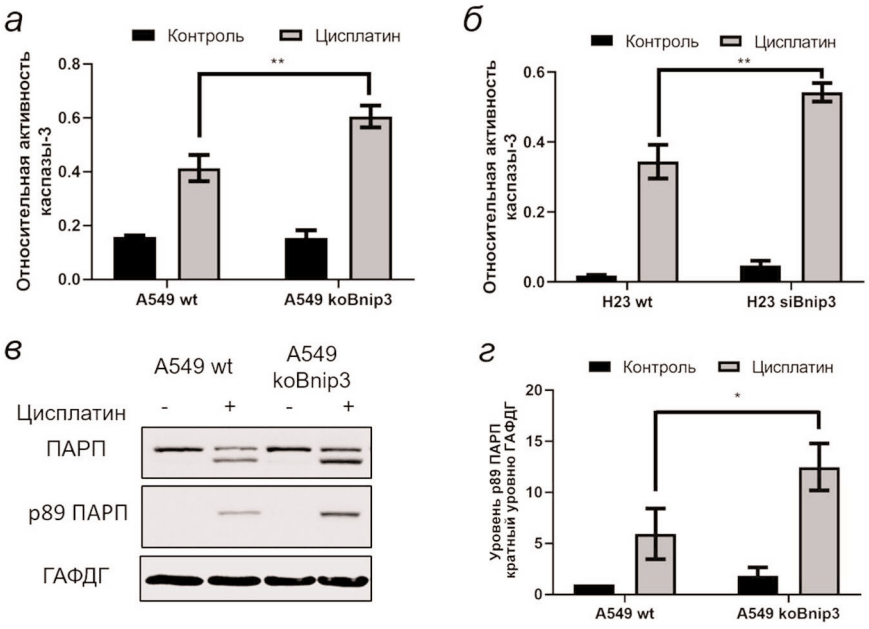


Рис. 3. Анализ активности каспазы-3 в клетках линий A549 (*а*) и H23 (*б*) дикого типа и со сниженной экспрессией BNIP3. Активность каспазы-3 нормализировали на уровень белка в образцах. Вестерн-блот маркера апоптоза – ПАРП (*в*) и гистограмма, соответствующая денситометрическому анализу уровня p89 ПАРП (*г*), в клетках линии A549 wt и A549 KoBNIP3 через 24 ч после индукции цисплатином. ГАФДГ использовали как контроль загрузки белка, относительно которого рассчитывали уровень p89 ПАРП. Эксперименты были выполнены в трех повторах

нокаутом и нокдауном по BNIP3 был более выражен, чем в контрольных клетках (рис. 2, *а–г*). При этом разницы между клетками с нокаутом и с нокдауном по BNIP3 не наблюдалось, поэтому дальнейшие эксперименты проводились на линии A549 KoBNIP3 со стабильно подавленной экспрессией BNIP3.

Оценка цисплатин-индуцированного апоптоза в линиях клеток со сниженной экспрессией BNIP3. Выход цитохрома *c* приводит к стимуляции каспазного каскада и активации эффекторной каспазы-3, ответственной за появление биохимических и морфологических признаков апоптоза. Оценка показала, что подавление

экспрессии BNIP3 в клетках линий A549 и H23 статистически достоверно приводило к стимуляции активности каспазы-3 спустя 24 ч после индукции апоптоза (рис. 3, *а*, *б*). Одной из мишеней эффекторных каспаз является поли(АДФ-рибоза)-полимераза (ПАРП). Расщепление ПАРП и появление фрагмента в 89 кДа (p89) относится к характерным признакам апоптотической гибели клетки. Анализ расщепления ПАРП также продемонстрировал повышенное накопление фрагмента p89 ПАРП в нокаутных клетках по сравнению с диким типом (рис. 3, *в*, *г*).

В дополнение к описанным выше признакам апоптоза был произведён анализ популяции SubG1 в клетках A549 wt и A549 KoBNIP3 методом проточной цитофлуориметрии. Популяция SubG1 отражает апоптотическую фракцию клеток, содержащих фрагментированную ДНК. Исследование показало, что в клетках дикого типа популяция SubG1 составляла 11,8%, в то время как в нокаутной линии она была в два раза выше – 26,3%. Таким образом, нами выявлено значительное усиление чувствительности к цисплатину в клетках, дефицитных по BNIP3, по сравнению с клетками дикого типа спустя 24 ч после индукции апоптоза (рис. 4), что согласуется с данными, полученными при оценке активности каспазы-3 и расщепления ПАРП.

Изменение уровня митохондриальных активных форм кислорода при нокауте BNIP3. Выход цитохрома *c* из митохондрий способен вызвать нарушение в функционировании дыхательной цепи, что ведет к утечке электронов и образованию супероксидного радикала [15]. Кроме того, цисплатин может вызывать образование мтАФК в результате непосредственного воздействия на митохондрии [16]. Это, в свою очередь, может внести вклад в стимуляцию клеточной гибели. Действительно, оценка содержания митохондриальных активных форм кислорода (мтАФК) с помощью метода проточной цитометрии после окрашивания флуоресцентным красителем MitoSox Red показала, что в клетках A549 KoBNIP3 их уровень после индукции апоптоза цисплатином был практически в два раза выше по сравнению с клетками дикого типа (рис. 5). Анализ проводился через 6, 12, 16 и 24 ч после индукции апоптоза. Для репрезентативности была выбрана точка 16 ч, так как именно в этот временной интервал наблюдалась максимальная разница в уровне мтАФК между линиями A549 wt и A549 KoBNIP3.

Для оценки вклада мтАФК в усиление апоптоза в линии, нокаутной по BNIP3, нами был проведен эксперимент с дополнительной обработкой клеток антиоксидантом Тролоксом, водорастворимым аналогом витамина Е. Тролокс способен предотвращать апоптоз, вызванный окислительным стрессом, индуцируемым широким спектром токсических агентов в различных внутриклеточных компартментах [17]. Клетки линии A549 wt и A549 KoBNIP3 2 ч инкубировали с различными концентрациями Тролокса в диапазоне от 100 до 500 мкМ, после чего подвергали индукции цисплатином в тече-

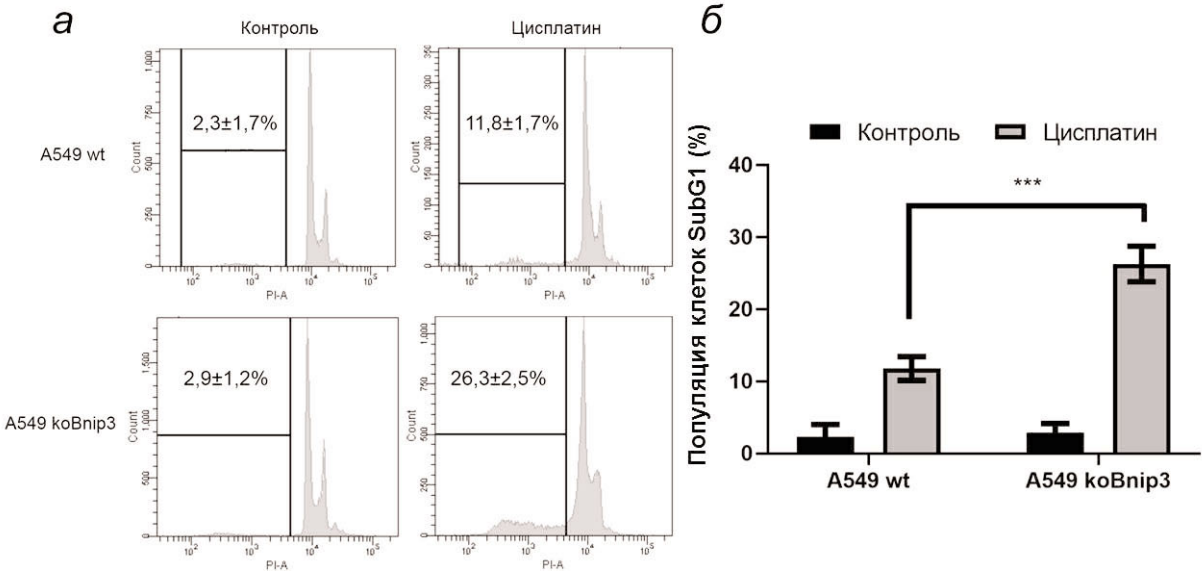


Рис. 4. Цитометрический анализ уровня апоптотической популяции SubG1 (*а*) клеток линии A549 wt и A549 KoBNIP3 через 24 ч после индукции цисплатином и гистограмма, соответствующая полученным результатам (*б*). Цитометрия была выполнена в трех повторах

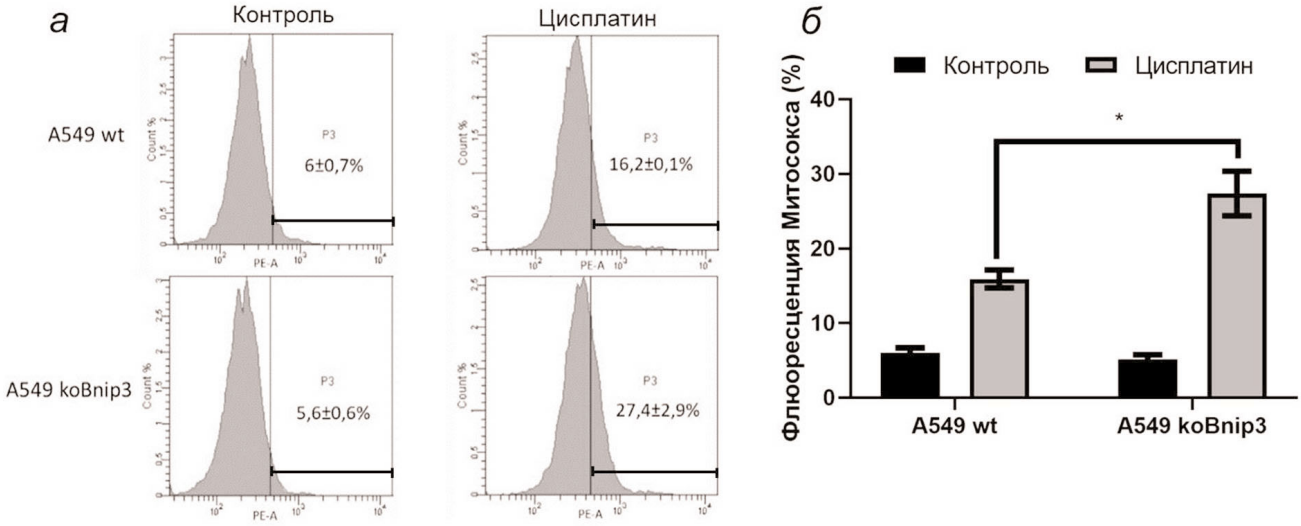


Рис. 5. Оценка мтАФК (*а*) в клетках линии A549 wt и A549 KoBNIP3 через 16 ч после индукции цисплатином и гистограмма, соответствующая полученным результатам (*б*). Цитометрия была выполнена в трех повторах

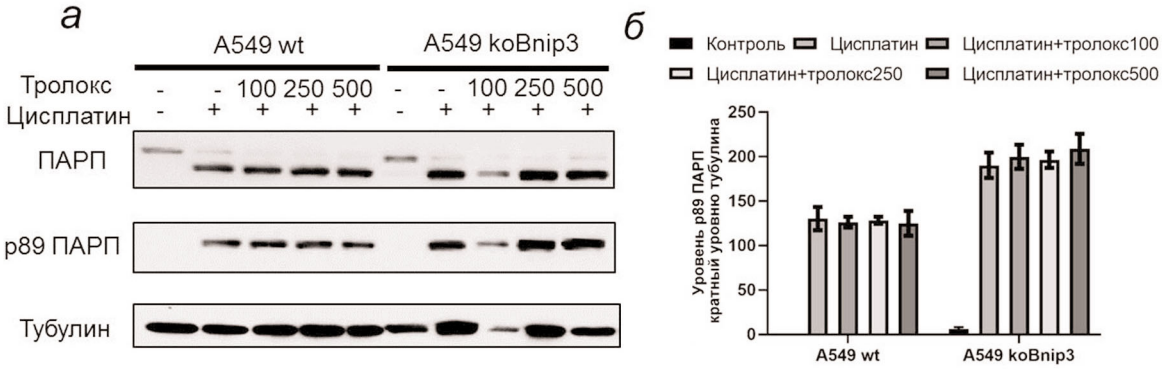


Рис. 6. Вестерн-блот-анализ маркера апоптоза – ПАРП (*а*) и гистограмма, соответствующая денситометрическому анализу уровня p89 ПАРП (*б*) в клетках линии A549 wt и A549 KoBNIP3. Тубулин использовали как контроль загрузки белка, относительно которого рассчитывали уровень p89 ПАРП. Эксперимент был выполнен в трех повторах

ние 24 ч. Данные эксперимента показали, что присутствие антиоксиданта не влияло на образование фрагмента p89 ПАРП в условиях индукции апоптоза (рис. 6). Отсутствие эффекта Тролокса на цисплатин-индуцированную гибель клеток линии A549 wt и A549 KoBNIP3 можно объяснить тем, что продукция АФК является лишь следствием пермеабилизации митохондриальной мембраны и не вносит сколь-либо существенный вклад в прогрессию апоптоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стимуляция апоптоза воздействием на митохондрии показала себя действенной стратегией утилизации опухолевых клеток [15, 18]. Повреждение митохондрий, дестабилизация внешней мембраны, стимуляция образования АФК – все это способствует индукции митохондриального пути апоптоза. Однако в клетке существуют системы, ответственные за поддержание контроля качества органелл. Работа этих систем по утилизации митохондрий, не справляющихся со своими функциями, способна снизить эффективность терапии. Важную роль в поддержании качества митохондрий и, следовательно, их функции как регуляторов клеточной гибели, контролируемой выходом цитохрома *c* в цитоплазму, играют белки системы митофагии, такие как PINK1-Parkin, BNIP3-Nix, а также деацетилазы семейства Сиртуинов (Sirt1-5), прямо или

опосредованно контролирующие митохондриальную аутофагию – митофагию [19]. Было показано, что накопление поврежденных митохондрий в результате ингибирования PINK1-Parkin- и Sirt3-зависимой митофагии способно усилить чувствительность к программируемой гибели клеток [20, 21]. Аналогичную роль регулятора митофагии играет белок BNIP3. Можно предположить, что он также потенциально способен регулировать гибель клеток, в частности апоптоз. В наших экспериментах клетки, дефицитные по BNIP3, демонстрировали пониженный уровень митохондриального дыхания по сравнению с клетками дикого типа вследствие того, что повреждённые митохондрии не удалялись из них (рис. 1). Присутствие в клетке популяции дефектных митохондрий делало ее более чувствительной к токсическим агентам. Действительно, нокаут по BNIP3 и, как следствие, подавление BNIP3-зависимой митофагии, существенно стимулировал выход цитохрома *c* в условиях индукции апоптоза (рис. 2). Это вызывало более интенсивную каспазную активность, что оценивалось как непосредственно, так и по накоплению продуктов расщепления одной из мишеней каспазы-3 – ПАРП и появлению фрагмента p89 ПАРП (рис. 3). Известно, что регулятор клеточного цикла белок p53 выполняет онкосупрессорную функцию, что может вносить вклад в ответ на стимуляцию клеточной гибели. Нами было установлено, что отношение фосфорилированной формы p53 (p-p53) к исходному белку увеличивается в присутствии цисплатина одинаково вне зависимости от присутствия BNIP3 как в клетках A549, так и H23. Отсутствие разницы в отношении p-p53 к p53 в клеточных линиях АКЛ дикого типа и дефицитных по BNIP3 дает основание предположить о p53-независимом механизме гибели клеток в процессе BNIP3-регулируемого апоптоза.

Данные, полученные нами на клетках АКЛ, согласуются с результатами, показанными как на опухолевых, так и на нормальных клетках [11, 22]. Клетки, имеющие поврежденные митохондрии с пониженным уровнем дыхания, более чувствительны к индукции апоптоза, что объясняется дестабилизацией электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и облегчению выхода цитохрома *c* [17, 23, 24]. Известно, что выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму приводит к блокированию переноса электронов в ЭТЦ и утечке электронов с образованием супероксидрадикала [25]. В наших условиях нокаут по BNIP3 приводил к появлению в клетках АФК в результате как блокирования дыхательной цепи, так и подавленной митофагии. В ряде исследований было продемонстрировано, что повышенный уровень мтАФК приводит к усилению клеточной гибели, в том числе и апоптозу [26–28]. Вместе с тем, имеются данные об отсутствии значимых эффектов АФК на гибель клеток или, наоборот, о стимуляции апоптоза при действии антиоксидантов в одиночном или совокупном воздействии с противоопухолевыми препаратами [29–31]. В наших условиях антиоксидант Тролокс не влиял на апоптоз, индуцированный цисплатином. По всей видимости, увеличение уровня мтАФК в клетках, погибающих по механизму апоптоза, является лишь следствием нарушения ЭТЦ митохондрии, обусловленного выходом цитохрома *c*, и связывание мтАФК антиоксидантом не предотвращает начавшийся процесс сборки апоптосомы, индуцированной выходом цитохрома *c*.

Полученные данные схематически представлены на рис. 7. Подавление экспрессии BNIP3 приводит к появлению поврежденных (дефектных) митохондрий, более подверженных деструктивным изменениям, в процессе индукции апоптоза. Это облегчает выход цитохрома *c*, интенсифицируя последующие этапы апоптозного каскада, в частности активацию каспазы-3. Можно предположить, что подавление митофагии в процессе противоопухолевой терапии позволит сделать ее более эффективной.

Снижению эффективности химиотерапии часто способствует приобретенная резистентность к используемому препарату, в частности к цисплатину. В этих условиях стимуляция иных

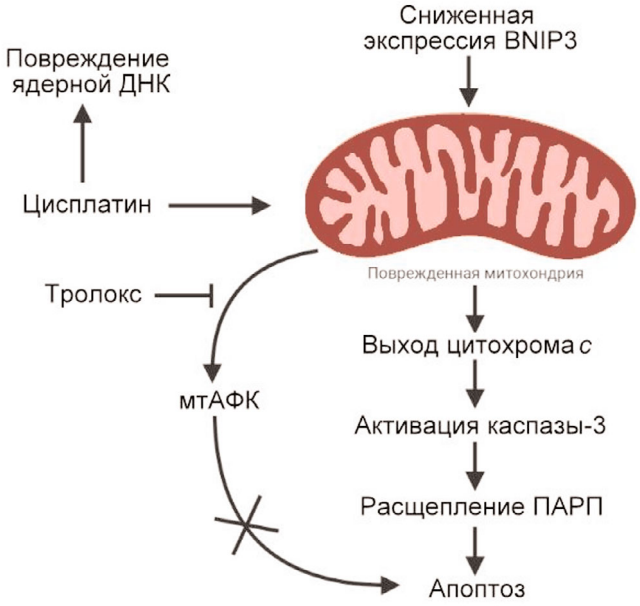


Рис. 7. Схематическое изображение регуляции цисплатин-индуцированного мтАФК-независимого апоптоза в клетках, дефицитных по BNIP3

процессов, прямо или косвенно модулирующих гибель клеток, может повысить чувствительность клеток к терапевтическому воздействию. Как было показано нами ранее, таким процессом может быть митофагия. Так, стимуляция митофагии подавляла апоптоз, вызванный цисплатином, тогда как ее ингибирование – стимулировало гибель клеток [32]. Участие белка BNIP3 в регуляции митофагии позволяет предположить, что подавление его экспрессии даст возможность обойти устойчивость опухолевых клеток к терапевтическим препаратам.

Однако следует иметь в виду, что предполагаемый подход, а именно ингибирование экспрессии BNIP3, следует рассматривать с осторожностью. Вполне возможно, что ингибиторы вызовут снижение экспрессии BNIP3 и в нормальных клетках, что также может вызывать стимуляцию гибели клеток. С этой точки зрения, поиски возможности направленного воздействия на опухолевые клетки с помощью низкомолекулярных соединений позволят обойти эту проблему и помогут в разработке терапии, нацеленной на BNIP3.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 19-15-00125). Работа лаборатории поддерживается РФФИ (гранты 20-015-00105, 20-315-90019 и 19-015-00332), а также Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) противораковыми обществами.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории исследования механизмов апоптоза МГУ имени М.В. Ломоносова Копеиной Гелине Сергеевне за ценные советы в процессе выполнения работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greulich, H. (2010) The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies, *Genes Cancer*, **1**, 1200-1210, doi: 10.1177/1947601911407324.
2. Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.*, **13**, 1899-1911, doi: 10.1101/gad.13.15.1899.
3. Zhang, J., and Ney, P. A. (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy, *Cell Death Differ.*, **16**, 939-946, doi: 10.1038/cdd.2009.16.
4. Mazure N. M., and Pouysségur, J. (2009) Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia, *Autophagy*, **5**, 868-869, doi: 10.4161/auto.9042.
5. Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J. H., Reed, J. C., Gietz, R. D., and Greenberg, A. H. (2000) BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites, *J. Biol. Chem.*, **275**, 1439-1448, doi: 10.1074/jbc.275.2.1439.
6. Lee, Y., Lee, H.-Y., Hanna, R. A., and Gustafsson, Å. B. (2011) Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, **301**, H1924-H1931, doi: 10.1152/ajpheart.00368.2011.
7. Hanna, R. A., Quinsay, M. N., Orogo, A. M., Giang, K., Rikka, S., and Gustafsson, Å. B. (2012) Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy, *J. Biol. Chem.*, **287**, 19094-19104, doi: 10.1074/jbc.M111.322933.
8. Sowter, H. M., Ratcliffe, P. J., Watson, P., Greenberg, A. H., and Harris, A. L. (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors, *Cancer Res.*, **61**, 6669-6673.
9. Chourasia, A. H., and Macleod, K. F. (2015) Tumor suppressor functions of BNIP3 and mitophagy, *Autophagy*, **11**, 1937-1938, doi: 10.1080/15548627.2015.1085136.
10. Koop, E. A., van Laar, T., van Wichen, D. F., de Weger, R. A., van der Wall, E., and van Diest, P. J. (2009) Expression of BNIP3 in invasive breast cancer: correlations with the hypoxic response and clinicopathological features, *BMC Cancer*, **9**, 175, doi: 10.1186/1471-2407-9-175.
11. Chourasia, A. H., Tracy, K., Frankenberger, C., Boland, M., Sharifi, M. N., et al. (2015) Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis, *EMBO Rep.*, **16**, 1145-1163, doi: 10.15252/embr.201540759.
12. Dasari, S., and Tchounwou, P. B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364-378, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
13. Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K., and Nakamura, Y. (1998) Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3, *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 230-235, PMID: 9523198.
14. Jiang, X., and Wang, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 87-106, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706.
15. Cai, J., and Jones, D. P. (1999) Mitochondrial redox signaling during apoptosis, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 327-334, doi: 10.1023/a:1005423818280.
16. Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., and Doetsch, P. W. (2013) Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions, *PLoS One*, **8**, e81162, doi: 10.1371/journal.pone.0081162.
17. Forrest, V. J., Kang, Y. H., McClain, D. E., Robinson, D. H., and Ramakrishnan, N. (1994) Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox, *Free Radic. Biol. Med.*, **16,** 675-684, doi: 10.1016/0891-5849(94)90182-1.
18. Schwerdt, G., Freudinger, R., Schuster, C., Weber, F., Thews, O., and Gekle, M. (2005) Cisplatin-induced apop-

tosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells, *Toxicol. Sci.*, **85**, 735-742, doi: 10.1093/toxsci/kfi117.
19. Vernucci, E., Tomino, C., Molinari, F., Limongi, D., Aventaggiato, M., Sansone, L., Tafani, M., and Russo, M. A. (2019) Mitophagy and oxidative stress in cancer and aging: focus on sirtuins and nanomaterials, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 1-19, doi: 10.1155/2019/6387357.
20. Qiao, A., Wang, K., Yuan, Y., Guan, Y., Ren, X., Li, L., Chen, X., Li, F., Chen, A. F., Zhou, J., Yang, J.-M., and Cheng, Y. (2016) Sirt3-mediated mitophagy protects tumor cells against apoptosis under hypoxia, *Oncotarget*, **7**, doi: 10.18632/oncotarget.9717.
21. Yao, N., Wang, C., Hu, N., Li, Y., Liu, M., et al. (2019) Inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy sensitizes multidrug-resistant cancer cells to B5G1, a new betulinic acid analog, *Cell Death Dis.*, **10**, 232, doi: 10.1038/s41419-019-1470-z.
22. Tol, M. J., Ottenhoff, R., van Eijk, M., Zelcer, N., Aten, J., et al. (2016) A PPARγ-Bnip3 axis couples adipose mitochondrial fusion-fission balance to systemic insulin sensitivity, *Diabetes*, **65**, 2591-2605, doi: 10.2337/db16-0243.
23. Koepke, S. J., Watkins, J. J., and Minteer, S. D. (2016) Understanding the role of mitochondrial health in the mechanism of mitochondrial bioelectrocatalysis, *J. Electrochem. Soc.*, **163**, H292-H298, doi: 10.1149/2.0681605jes.
24. Cocetta, V., Ragazzi, E., and Montopoli, M. (2019) Mitochondrial Involvement in cisplatin resistance, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3384, doi: 10.3390/ijms20143384.
25. Zhu, Y., Li, M., Wang, X., Jin, H., Liu, S., Xu, J., and Chen, Q. (2012) Caspase cleavage of cytochrome *c1* disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome c release, *Cell Res.*, **22**, 127-141, doi: 10.1038/cr.2011.82.
26. Kleih, M., Böpple, K., Dong, M., Gaißler, A., Heine, S., Olayioye, M. A., Aulitzky, W. E., and Essmann, F. (2019) Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells, *Cell Death Dis.*, **10**, 851, doi: 10.1038/s41419-019-2081-4.
27. Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssière, J.-L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling, *Biochimie*, **84**, 131-141, doi: 10.1016/S0300-9084(02)01369-X.
28. Sp, N., Kang, D. Y., Jo, E. S., Rugamba, A., Kim, W. S., et al. (2020) Tannic acid promotes TRAIL-induced extrinsic apoptosis by regulating mitochondrial ROS in human embryonic carcinoma cells, *Cells*, **9**, 282, doi: 10.3390/cells9020282.
29. Monticone, M., Taherian, R., Stigliani, S., Carra, E., Monteghirfo, S., et al. (2014) NAC, Tiron and Trolox impair survival of cell cultures containing glioblastoma tumorigenic initiating cells by inhibition of cell cycle progression, *PLoS One*, **9**, e90085, doi: 10.1371/journal.pone.0090085.
30. Diaz, Z., Colombo, M., Mann, K. K., Su, H., Smith, K. N., et al. (2005) Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines, *Blood*, **105**, 1237-1245, doi: 10.1182/blood-2004-05-1772.
31. Zheng, J., Payne, K., Taggart, J. E., Jiang, H., Lind, S. E., and Ding, W.-Q. (2012) Trolox enhances curcumin's cytotoxicity through induction of oxidative stress, *Cell. Physiol. Biochem.*, **29**, 353-360, doi: 10.1159/000338490.
32. Abdrakhmanov, A., Kulikov, A. V., Luchkina, E. A., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2019) Involvement of mitophagy in cisplatin-induced cell death regulation, *Biol. Chem.*, **400**, 161-170, doi: 10.1515/hsz-2018-0210.

BNIP3 AS A REGULATOR OF CISPLATIN-INDUCED APOPTOSIS

A. S. Gorbunova[1], T. V. Denisenko[1], M. A. Yapryntseva[1], A. D. Pivnyuk[1], T. A. Prikazchikova[2], V. G. Gogvadze[1,3], and B. Zhivotovsky[1,3]*

[1] *Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: boris.zhivotovsky@ki.se*

[2] *Skolkovo Institute of Science and Technology, Center of Life Sciences, 121205 Moscow, Russia*

[3] *Karolinska Institute, Institute of Environmental Medicine, SE-171 77 Stockholm, Sweden*

Received July 16, 2020
Revised August 27, 2020
Accepted August 28, 2020

BNIP3 is a member of Bcl-2 family of proteins involved in regulation of various forms of cell death. However, its role in these processes remains unclear and varies depending on the type of cancer cells and environmental factors (pH, O_2 level, etc.). Here, the role of BNIP3 in apoptosis regulation in lung adenocarcinoma cells was investigated. The suppressed expression of BNIP3 caused inhibition of oxygen consumption and stimulated production of the mitochondrial reactive oxygen species, suggesting the role of BNIP3 in induction of mitochondrial dysfunction and its potential involvement in regulation of cell death. Indeed, cytochrome *c* release in the cells with BNIP3 knockout and knockdown was higher than in the wild-type (WT) upon apoptosis stimulation by cisplatin. Moreover, suppression of BNIP3 expression led to the increase in the caspase-3 activity and, as a consequence, accumulation of the apoptotic marker – p89 fragment of poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) – as compared to WT cells. Analysis of the SubG1 population by flow cytometry confirmed the elevated level of apoptosis in the BNIP3 knockout cells. Pretreatment with the antioxidant Trolox did not affect cell death, indicating that it was independent on reactive oxygen species. These data show that BNIP3 is involved in maintaining normal functioning of mitochondria and, as a result, can regulate the mitochondrial pathway of cell death.

Keywords: BNIP3, apoptosis, mitophagy, lung adenocarcinoma, cisplatin

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1474 – 1488

УДК 577.29

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И АНТИОКСИДАНТЫ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Обзор

© 2020 С.М. Вострикова[1,2], А.Б. Гринев[2], В.Г. Гогвадзе[1,3]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vlad_gogvadze@rambler.ru*

[2] *Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) 119991 Москва, Россия*

[3] *Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology, Karolinska Institutet, Stockholm, 17177 Sweden*

Поступила в редакцию 14.07.2020
После доработки 07.08.2020
Принята к публикации 07.08.2020

Тщательно регулируемый баланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и их утилизацией лежит в основе нормального функционирования организма. АФК играют важную роль в регуляции большого числа метаболических процессов, однако превышение их уровня в организме чревато развитием разного рода заболеваний, в частности, онкологических, что происходит вследствие вызванных АФК мутаций ДНК. В опухолях повышенный фон кислородных радикалов способствует процессам пролиферации и метастазирования. С другой стороны, высокий уровень АФК способен вызывать гибель клеток; это свойство АФК используется в противоопухолевой терапии. Водо- и жирорастворимые антиоксиданты, а также антиоксидантные ферментные системы подавляют появление АФК, однако использовать их следует с осторожностью. Антиоксиданты могут подавлять зависимую от АФК пролиферацию и метастазирование, но в то же время в процессе противоопухолевой терапии они будут ингибировать гибель клеток опухоли в случае использования терапевтических средств, стимулирующих окислительный стресс. Данные по действию антиоксидантов на гибель опухолевых клеток, а также относительно применения антиоксидантов в качестве диетических добавок во время противоопухолевой терапии достаточно противоречивы. В обзоре рассмотрены механизмы, согласно которым антиоксиданты могут действовать на опухолевые и здоровые клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак, антиоксиданты, канцерогенез, активные формы кислорода, программируемая гибель клеток, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0320972520100139

ВВЕДЕНИЕ

Развитие опухоли – многоступенчатый процесс, характеризующийся определенными нарушениями клеточного метаболизма. Hanahan и Weinberg [1] выделяют 10 физиологических признаков, отличающих опухолевую клетку от нормальной. Одним из основных признаков является подавление процесса программируемой гибели клеток (ПГК), позволяющего в нормальных тканях избавляться от клеток, выполнивших свои функции, а также дефектных и потенциально опасных клеток. Нарушение этого процесса чревато развитием опухолей. Одним из наиболее изученных форм ПГК является апоптоз, препятствующий накоплению клеток с генетическими отклонениями, что предотвращает опухолевую трансформацию. Стимуляция апоптоза в опухолевых клетках является действенной стратегией противоопухолевой терапии. Помимо апоптоза в настоящее время известен целый ряд различных видов ПГК, различающихся по биохимическим и морфологическим признакам – некроптоз, ферроптоз, аутофагическая гибель клетки, аноикис [2]. В подавляющем большинстве из них важную роль в их стимуляции и протекании играют активные формы кислорода (АФК). Действие целого ряда противоопухолевых препаратов основано на стимуляции в клетках окислительного стресса и генерации АФК в количе-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; SOD – супероксиддисмутаза; GPx – глутатионпероксидаза; NF-κB – ядерный фактор каппа-Би; TNF-α – фактор некроза опухолей; ПГК – программируемая гибель клеток; NOX – NADPH-оксидаза; МАО – моноаминоксидаза; HIF – фактор, индуцированный гипоксией; МРТ – индукция неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны (mitochondrial permeability transition).

* Адресат для корреспонденции.

стве, превышающем способности защитных систем клетки. Стимуляция окислительного стресса способна инициировать различные формы гибели клеток, в частности, апоптоз, что ведет к уничтожению опухолевых клеток.

Следует отметить, что АФК не только участвуют в стимуляции апоптоза, но и являются одним из факторов, способствующим возникновению опухолей. АФК канцерогенны по своей природе [3]. Окислительное повреждение клеточной ДНК способно вызывать мутации и, следовательно, играть важную роль в инициации и прогрессии многостадийного процесса канцерогенеза. Не следует забывать, что на физиологическом уровне АФК играют роль регуляторов клеточного метаболизма. Образование АФК в дыхательной цепи митохондрий, в реакциях с участием циклооксигеназ, NADPH-оксидаз (NOX), ксантиноксидаз и липоксигеназ создает определённый фон АФК и обеспечивает работу важнейших внутриклеточных процессов, включая пролиферацию и дифференциацию.

Накоплению АФК препятствуют антиоксидантные системы клетки, а также водо- и жирорастворимые антиоксиданты, которые способны, с одной стороны, подавлять пролиферацию раковых клеток, а с другой – ингибировать их гибель в случае использования терапевтических средств, стимулирующих окислительный стресс. Данные по действию антиоксидантов на гибель опухолевых клеток, а также относительно применения антиоксидантов в качестве диетических добавок во время противоопухолевой терапии достаточно противоречивы. В настоящем обзоре рассмотрены механизмы, согласно которым антиоксиданты могут действовать на опухолевые и здоровые клетки.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И ИХ РОЛЬ В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ ОРГАНИЗМА

АФК вовлечены в широкий спектр патологий, включая злокачественные новообразования, сахарный диабет II типа, атеросклероз, хронические воспалительные процессы, нарушения, вызванные ишемией и последующей реперфузией, а также нейродегенеративные заболевания. Клетка не только подвергается воздействию АФК извне, но и сама продуцирует радикалы кислорода. Одним из основных источников АФК в клетке являются митохондрии. Обычное четырех электронное восстановление O_2 в дыхательной цепи, в результате чего образуются две молекулы воды, катализируется комплексом IV митохондриальной дыхательной цепи. Однако присутствие в цепи переноса электронов нескольких окислительно-восстановительных центров (например, в комплексе I и III) (рис. 1, *а*) ведет к «утечке» электронов с образованием супероксид радикала, который можно рассматривать как предшественник большинства АФК. Такое одноэлектронное восстановление кислорода термодинамически благоприятно для большинства митохондриальных оксидоредуктаз [4]. В дополнение к дыхательной цепи, источником АФК, в частности перекиси водорода (H_2O_2), служит моноаминоксидаза (МАО) (рис. 1, *б*), флавопротеин, локализованный на внешней мембране митохондрий. МАО катализирует окислительное дезаминирование первичных ароматических аминов наряду с длинноцепочечными диаминами и третичными циклическими аминами [5]. Поскольку H_2O_2 легко проходит через митохондриальные мембраны, МАО может способствовать повышению концентрации АФК в митохондриальном матриксе и цитозоле.

Источником АФК могут быть не только митохондрии, но и NADPH-оксидазы – ферментативный комплекс, осуществляющий реакцию окисления NADPH до $NADP^+$ с переносом электронов с внутренней стороны цитоплазматической мембраны на внешнюю, где из молекулярного кислорода среды образуется супероксид радикал (рис. 1, *в*) [6]. Один из членов семейства – NOX4 – генерирует H_2O_2, способную проникать через мембраны [7]. Стимуляция экспрессии NOX4 способствует развитию острой почечной недостаточности [8], что приводит к диабетической нефропатии и почечной карциноме. В основе этих нарушений лежит один из видов ПГК, некроптоз – запрограммированный некроз.

Следует отметить, что митохондрии являются не только источником АФК, но также их чувствительной мишенью. АФК, продуцируемые митохондриями, могут окислять белки и вызывать перекисное окисление липидов, нарушая барьерные свойства биологических мембран. Одна из мишеней АФК – митохондриальная ДНК (мтДНК), которая кодирует несколько ферментов дыхательной цепи митохондрий. В условиях повышенного образования АФК (окислительного стресса) уровень окислительно-модифицированных оснований в мтДНК в 10–20 раз выше, чем в ядерной ДНК [9]. Повреждение мтДНК способно приводить к накоплению повреждений дыхательной цепи и, как следствие, к деэнергизации и гибели клетки.

Неконтролируемое накопление АФК в клетке сдерживается присутствием водо- и жирорастворимых антиоксидантов (глутатион, витами-

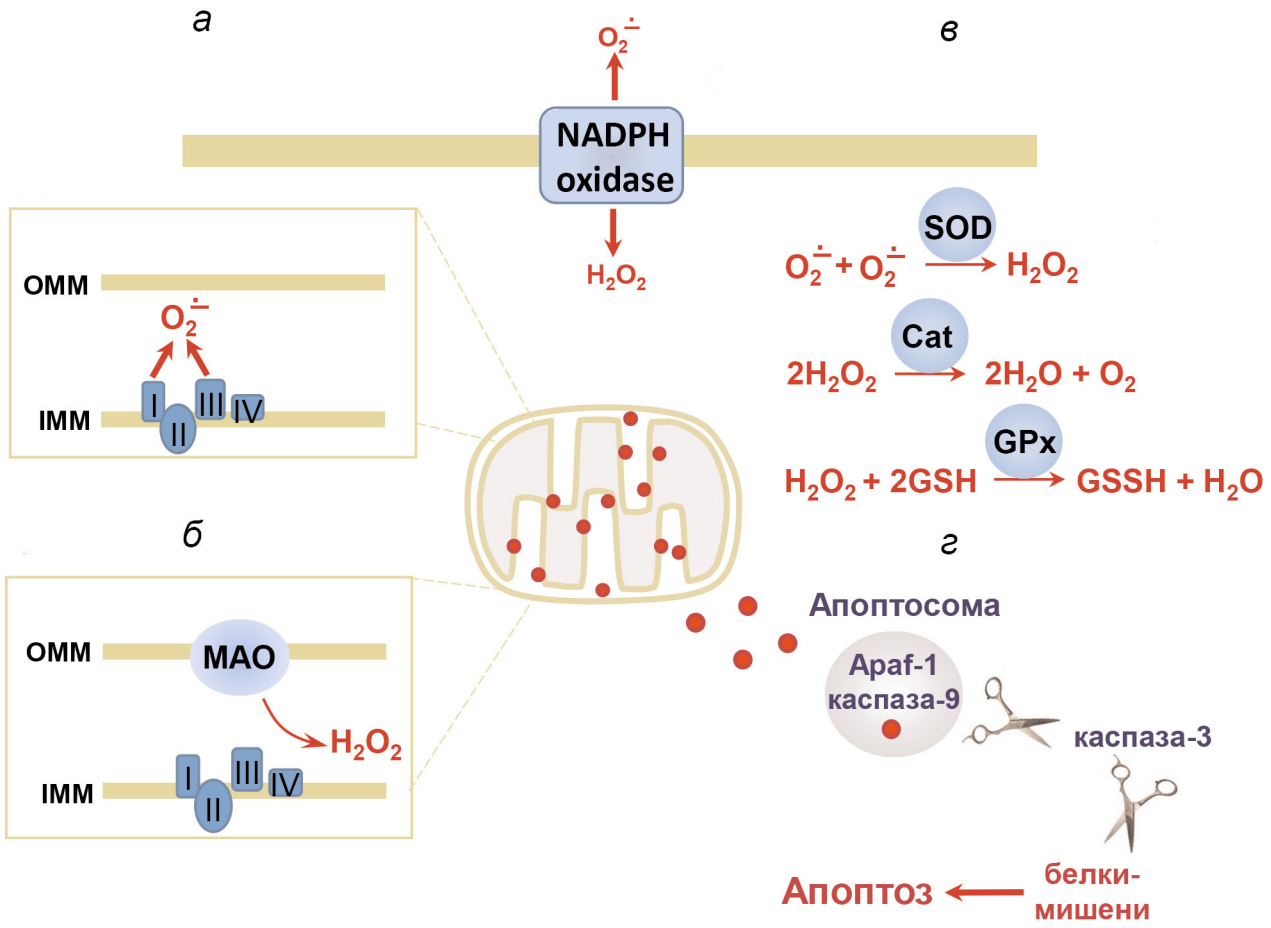


Рис. 1. Основными источниками активных форм кислорода (АФК) в клетке являются дыхательная цепь митохондрий на внутренней митохондриальной мембране (*а*); моноаминоксидаза (MAO) на внешней митохондриальной мембране (*б*); NADPH оксидаза на плазматической мембране (*в*); образование АФК сдерживается антиоксидантными системами клетки – каталазой (Cat), супероксиддисмутазой (SOD), глутатионпероксидазой (GPx) (*г*); АФК стимулируют пермеабилизацию внешней мембраны митохондрий, запуская митохондриальный путь апоптоза (*д*); IMM – внутренняя мембрана митохондрий, OMM – внешняя мембрана митохондрий

ны A, C и E и флавоноиды), а также работой ферментативных систем детоксикации активных форм кислорода. Так, дисмутация супероксидных радикалов ферментом супероксиддисмутазой приводит к образованию H_2O_2, которая может впоследствии утилизироваться ферментом каталазой или зависимой от глутатиона ферментной системой, включающей глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу (рис. 1, *г*). В присутствии металлов переменной валентности H_2O_2 может разлагаться в реакции Хабера–Вейсса с образованием высоко реактивного и токсичного гидроксильного радикала.

Дисбаланс между образованием АФК и уровнем антиоксидантной защиты способствует развитию таких патологий как атеросклероз, диабет, фиброз легких, артрит, а также болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона [6]. В частности, у мышей с дефицитом медь- и цинксодержащей супероксиддисмутазы (Cu-Zn-SOD) на раннем этапе развития не проявлялись сколь либо выраженные аномалии, но при этом возрастал риск развития гепатоцеллюлярной карциномы из-за усиленной пролиферации и повреждения жизненно важных макромолекул вследствие повышенного содержания АФК [10]. Отсутствие Mn-SOD у мышей способствует развитию кардиомиопатии и метаболического ацидоза, накоплению липидов в скелетной мышце и печени, что, в конечном итоге, вызывает летальный исход вскоре после рождения [11]. Эти данные подчеркивают важнейшую роль Mn-SOD в регуляции окислительного стресса и свидетельствуют о способности АФК при высоких концентрациях вызывать серьезные повреждения в клетке.

В физиологических концентрациях АФК играют регуляторную роль в клеточных метаболических процессах, активируя различные ферментативные каскады и транскрипционные

факторы. Несмотря на то, что АФК являются побочными продуктами дыхания, обладающими токсичными свойствами и способствующими развитию многих заболеваний, они вовлечены в процессы регуляции клеточного метаболизма, в частности, пролиферации клеток. Образование АФК происходит при стимуляции клеток цитокинами, такими как трансформирующий фактор роста – β1 [12], интерлейкин-1 и фактор некроза опухолей [13]. Это показывает, что продукция в цитозоле АФК является регулируемым процессом, и АФК служат в качестве сигнальных молекул, участвующих в многообразных клеточных процессах, включая передачу сигналов фактора роста, воспаление, вовлечение интегринов, адгезию к внеклеточному матриксу. Подавление образования АФК приводит к блокировке передачи внутриклеточных сигналов [14].

Процессы образования и детоксикации АФК сбалансированы в тканях организма. Так, белок OxyR, экспрессируемый в *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli*, активируемый в результате окислительной модификации, регулирует, в свою очередь, транскрипцию генов, отвечающих за предотвращение окислительного стресса [15]. Нарушение этого баланса может вызывать различные формы патологий. Неконтролируемое умеренное повышение содержания АФК может привести к временной или постоянной задержке роста, т.е. к репликативному старению – явлению, связанному с утратой клетками способности к делению. Тогда как значительное возрастание уровня АФК в клетке может привести к гибели клетки путем аутофагии, апоптоза, некроптоза или некроза [16].

АФК И РАК

АФК канцерогенны по своей природе и играют ведущую роль в развитии злокачественных новообразований [17]. Многочисленные канцерогены способны генерировать АФК в процессе их метаболизирования. Последующее окислительное повреждение ядерной и митохондриальной ДНК приводит к мутациям, что играет важную роль в инициации и прогрессии канцерогенеза [3]. Вызванные АФК повреждения ДНК, такие как модификация оснований, нарушение нуклеотидной последовательности ДНК, неправильное кодирование, дупликация генов и активация онкогенов, вовлечены в этиологию различных видов рака. Способность АФК воздействовать на основные метаболические процессы, такие как пролиферация, апоптоз, старение, косвенно влияет на процессы малигнизации.

Причины повышенного содержания АФК в клетках опухоли достаточно разнообразны. В дополнение к АФК, возникающим в результате утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий, образованию АФК в клетке способствует экспрессия известных онкогенов, таких как *KRAS* и *MYC* [18, 19]. В качестве белков, связывающих GTP, HRas, KRas и NRas участвуют в процессе внутриклеточной сигнализации. Однако мутированный *KRAS*, обнаруживаемый в 30% опухолей, постоянно активирован. Воздействуя на NADPH-оксидазу, KRas стимулирует образование АФК, что обеспечивает усиленную пролиферацию и выживание опухолевых клеток [20].

Стимуляция АФК в клетке способствует перепрограммированию ее метаболизма. Большинство солидных опухолей развиваются в условиях гипоксии – пониженного содержания кислорода. Это приводит к стабилизации фактора, индуцированного гипоксией (HIF, hypoxia-inducible factor), необходимого для адаптации к новым условиям [21]. Так, в условиях гипоксии HIF активирует гены, обеспечивающие выживание клеток злокачественной опухоли, а также гены, регулирующие метаболизм глюкозы, ангиогенез (например, фактор роста эндотелия сосудов) и опухолевую инвазию. Следует отметить, что HIF может стабилизироваться и под действием АФК. Так, в условиях гипоксии комплекс III дыхательной цепи митохондрий продуцирует избыточное количество супероксид радикала, внося вклад в стабилизацию HIF [22].

Наряду с повышенной продукцией АФК опухолевыми клетками, для них также характерно увеличение активности антиоксидантных ферментов, что позволяет клеткам избегать гибели, вызванной избытком АФК, в то же время поддерживая уровень радикалов, способствующий пролиферации и метастазированию [23]. Исследователями была отмечена стимуляция экспрессии таких антиоксидантных ферментов, как SOD, глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза в митохондриях клеток колоректального рака человека в сравнении с неопухолевыми клетками [24]. При изучении клеток астроцитомы, глиальной опухоли головного мозга было обнаружено увеличенное содержание MnSOD в клетках глиобластомы III и IV степени злокачественности [25]. В то же время в клетках астроцитомы II степени злокачественности не наблюдалось повышения содержания этого фермента, это свидетельствует о том, что с увеличением степени злокачественности может увеличивается как уровень окислительного стресса в клетках, так и соответствующий уровень защиты. Интересно отметить, что стимуля-

ция экспрессии MnSOD подавляла рост опухоли путем снижения содержания HIF-1 и фактора роста эндотелия сосудов [26]. Помимо MnSOD, увеличение содержания SOD наблюдалось в клетках карциномы яичников [27]. В дополнение к этому было зафиксировано повышенное содержание антиоксиданта глутатиона, что лежит в основе резистентности клеток карциномы яичников к цисплатину и таксану, соединениям, применяемым в терапии этих опухолей [28].

Важно отметить, что в геноме клеток некоторых раковых опухолей могут быть мутации, повышающие антиоксидантную защиту клетки, что приводит к снижению количества АФК, и, соответственно, к угнетению апоптоза. Так, была обнаружена корреляция между наличием определенных аллелей в нескольких «антиоксидантных» генах, регулирующих метаболизм селена и витамина Е, и высоким риском развития рака простаты [29]. Двухаллельная инактивация гена *KEAP1*, часто наблюдаемая в клетках немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), приводит к конститутивной экспрессии ядерного фактора Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2), ответственного за содержание антиоксидантных белков, защищающих клетку от окислительного стресса [30].

Повышенное образование АФК не только лежит в основе мутагенеза, но и способствует клеточной пролиферации и последующей опухолевой инвазии. Поэтому можно предположить, что применение антиоксидантов позволило бы ограничить рост опухоли. Действительно, как выяснилось, стимуляция экспрессии супероксиддисмутазы способна подавлять пролиферацию как минимум 13 типов опухолей [31]. В клетках НМРЛ A549, обладающий антиоксидантными свойствами куркумин, подавлял пролиферацию, а также повышал содержание SOD и гамма-глутамилцистеин синтетазы, фермента, участвующего в синтезе глутатиона [32]. АФК воздействуют на клеточную пролиферацию разными путями, используя различные мишени. Так, повышенная каталитическая активность протеинкиназы С (PKC) обеспечивает рост опухоли и дальнейшую инвазию [33]. Некоторые изоформы PKC имеют структурные особенности, которые делают их восприимчивыми к окислительным модификациям. *N*-концевая регуляторная часть легко окисляется перекисью, в результате чего нарушается ее аутоингибирующая функция и фермент активируется. Это происходит в определенном диапазоне концентраций АФК, поскольку избыток АФК ведет к инактивации фермента [34]. Антиоксиданты, такие как витамин Е, куркумин, полифенольные и содержащие селен соединения, воздействуют на С-концевой домен, модификация которого приводит к снижению ферментативной активности PKC [35]. Таким образом, антиоксиданты способны снизить активность PKC в опухолевых клетках, что может сдерживать их пролиферацию и дальнейшее развитие опухоли. Предрасположенность к неконтролируемому делению клеток обусловлена активацией транскрипционного фактора c-Myc, что подавлялось добавлением антиоксидантов аскорбиновой кислоты и митохондриально-направленного витамина Е [36]. Антиоксидант *N*-ацетил-L-цистеин (NAC) подавлял развитие привитой В-клеточной лимфомы, экспрессирующей c-Myc, при этом снижался и уровень HIF, что говорит о функциональной взаимосвязи этих транскрипционных факторов. Действуя согласованно, HIF и c-Myc способны «перепрограммировать» метаболизм, синтез белка и клеточный цикл клетки, реализуя ее адаптационный ответ к пониженному содержанию кислорода [36, 37].

В условиях гипоксии отмечается активация транскрипционного фактора NF-kB, регулирующего экспрессию генов, отвечающих за клеточную пролиферацию, миграцию и апоптоз [38]. Активация NF-kB в условиях гипоксии зависит от АФК, а добавление антиоксиданта NAC подавляет образование свободных радикалов и блокирует активацию этого фактора [22]. Аналогичным образом обработка фибробластов с онкогенным Ras антиоксидантом NAC приводит к снижению митотической активности этих клеток [18].

Неоднократно была отмечена способность опухолевых клеток к усиленной пролиферации, в основе которой лежала реализация пути, контролирующего активность белка ретинобластомы (pRb) [39]. В норме данный белок ограничивает клеточную пролиферацию, связываясь с транскрипционным фактором E2F и ингибируя его, в результате чего pRb приостанавливает репликацию ДНК и не дает клетке перейти в S-фазу клеточного цикла [40]. В случае фосфорилирования pRb он становится неактивен, и клетка переходит из G1 в фазу S [41]. При онкогенезе компоненты Rb-E2F пути часто модифицируются, в ходе чего стимулируется неконтролируемая клеточная пролиферация. Мутации гена, кодирующего pRb, выполняющего функции супрессора опухолей, либо компонентов, регулирующих путь CDK-Rb-E2F, обнаружены практически во всех опухолях человека. В исследовании влияния природного антиоксиданта, полученного из экстракта шпината, на клетки рака предстательной железы была обнаружена задержка клеточного цикла в G1-фазе [42].

Более того, в клетках была снижена экспрессия E2F, а также наблюдалось пониженное содержание фосфорилированной формы pRb. В недавнем исследовании было изучено влияние антиоксиданта эпигаллокатехин-3-галлата (относится к группе флавоноидов), содержащемся в зеленом чае, на клетки миелоидного лейкоза, в ходе чего также наблюдали снижение клеточной пролиферации наряду с повышенной экспрессией pRb и ингибированием связывания E2F с ДНК [43].

Нельзя не отметить, что использование антиоксидантов для подавления роста опухоли следует проводить крайне осторожно, поскольку зачастую антиоксиданты способны, напротив, стимулировать рост опухоли. Так, на мышиных моделях рака легких, вызванного экспрессией *BRAF* и *KRAS*, добавка к рациону антиоксидантов NAC и витамина E значительно стимулировала прогрессию опухоли и снижала выживаемость. Как и ожидалось, антиоксиданты снижали содержание АФК и повреждение ДНК, но помимо этого они снижали экспрессию p53 [44]. Причем инактивация p53 имела такие же последствия, как и использование антиоксидантов. По мнению авторов, антиоксиданты могут способствовать росту опухоли на ранних стадиях, либо даже в предраковом состоянии у групп с определенной степенью риска, в частности, у курильщиков или пациентов с заболеванием легких. Антиоксиданты не только способствуют росту опухоли, но и стимулируют процессы метастазирования. Это происходит вследствие стабилизации транскрипционного фактора BACH1, активирующего транскрипцию гексокиназы II и GAPDH, что повышает вклад гликолиза в энергетику клетки и стимулирует процесс зависимого от гликолиза метастазирования [45]. Ведущую роль в этом процессе играет белок Nrf2, активирующий метастазирование путем подавления деградации BACH1 [46].

Таким образом, повышенное содержание АФК в клетках опухоли способствует не только стабильной клеточной пролиферации и последующей опухолевой инвазии [47], но и приобретению устойчивости этих клеток к химиотерапевтическим препаратам, предполагающим их элиминацию посредством стимуляции окислительного стресса. Антиоксиданты можно рассматривать в качестве агентов, способных снижать интенсивность пролиферативных сигналов в опухолевых клетках. Однако если защитные системы не справляются, а образование АФК происходит слишком интенсивно, это может привести к гибели клеток, в частности к апоптозу.

МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА

Различают два пути индукции апоптоза: рецептор-зависимый сигнальный путь (внешний) и митохондриальный (внутренний) [48]. Внешний путь реализуется с участием рецепторов клеточной смерти. Внутренний путь включает в себя пермеабилизацию внешней митохондриальной мембраны с последующим выходом цитохрома *c* и других белков из межмембранного пространства митохондрий. Оказавшись в цитозоле, цитохром *c* взаимодействует в присутствии dATP с его адаптерной молекулой, фактором, активирующим апоптотические протеазы (Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1), что приводит к образованию комплекса апоптосомы, в которой происходит процессинг и активация каспазы-9. Активная каспаза-9, в свою очередь, расщепляет и активирует каспазу-3 и каспазу-7. Следовательно, пермеабилизация внешней мембраны митохондрий является решающим событием индукции митохондриального пути апоптоза (рис. 1, *д*).

Митохондрии могут участвовать и во внешнем пути активации гибели клеток. Так, каспаза-8 способна расщеплять не только каспазу-3, но и цитозольный белок Bid. Усеченная форма этого белка *t*Bid (truncated Bid) способствует олигомеризации белков Bax или Bak и встраиванию их во внешнюю мембрану митохондрий с образованием неспецифической поры, через которую, как сказано выше, белки из межмембранного пространства митохондрий выходят в цитозоль. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 на уровне митохондрий способны связывать проапоптотические, блокируя образование поры, и, соответственно, индукцию апоптоза [49].

В ряде случаев выход цитохрома *c* происходит по пути, независимому от белков Bax или Bak [50]. Пермеабилизация может происходить вследствие индукции так называемой неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны (mitochondrial plermeability transition, MPT) вследствие открытия неспецифической поры во внутренней мембране митохондрий [51]. Открытие сопровождается падением мембранного потенциала, неконтролируемым поступлением воды и растворенных веществ в матрикс митохондрий, что ведет к набуханию органелл. Вследствие набухания внутренняя мембрана расправляется, вызывая разрыв внешней мембраны и выход белков из межмембранного пространства в цитозоль. Этот механизм пермеабилизации внешней митохондриальной мембраны более характерен для некротической гибели клеток, однако в ряде случаев наблюдается и

при апоптозе, в частности, когда пермеабилизации подвергается небольшая субпопуляция митохондрий, находящихся в зонах повышенной концентрации ионов кальция (например, в непосредственной близости от эндоплазматического ретикулума), в то время как большая их часть остается интактной.

Таким образом, сохраняя интактность митохондрий, можно предотвратить развитие гибели клеток, тогда как воздействие на митохондрии с целью пермеабилизации внешней митохондриальной мембраны может стимулировать клеточную гибель.

УЧАСТИЕ АФК В ГИБЕЛИ КЛЕТКИ

Как отмечалось выше, ключевое событие митохондриального пути апоптоза – выход цитохрома *c* из митохондрий – может быть опосредован как проапоптотическими белками семейства Bcl-2, так и открытием неспецифической поры во внутренней митохондриальной мембране. АФК способны стимулировать оба из этих путей. Так, АФК способствуют открытию неспецифической поры во внутренней мембране митохондрий вследствие окисления тиоловых групп переносчика адениновых нуклеотидов, одного из структурных компонентов поры [52]. Последующее набухание органелл и разрыв внешней митохондриальной мембраны приводят к выходу проапоптотических факторов (рис. 2, *а*). С другой стороны, АФК вызывают образование дисульфидных мостиков между мономерами Bax, что облегчает его встраивание во внешнюю мембрану с образованием поры [53] (рис. 2, *б*). Кроме того, АФК способны окислять кардиолипин, связывающий цитохром *c* (рис. 2, *в*), что не только увеличивает пул свободного цитохрома *c* [54], но и способствует выходу проапоптотических факторов из митохондрий [55].

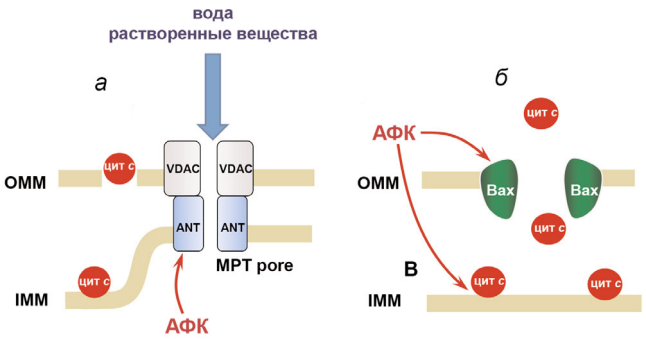


Рис. 2. АФК стимулируют пермеабилизацию внешней мембраны митохондрий: *а* – вызывая индукцию неспецифической проницаемости в результате окисления сульфгидрильных групп переносчика адениновых нуклеотидов (ANT); *б* – вследствие образования дисульфидных мостиков между мономерами Bax, что облегчает их встраивание во внешнюю мембрану с образованием поры; *в* – в результате окисления кардиолипина, связывающего цитохром *c*, что приводит к увеличению пула свободного цитохрома *c*

АФК могут также образовываться и в процессе апоптоза, что в данном случае является не причиной, а следствием индукции гибели клеток. Так, выход цитохрома *c* приводит к нарушению работы дыхательной цепи, что стимулирует утечку электронов с образованием супероксид радикала [56]. Кроме того, в качестве прооксиданта может выступать сам цитохром *c*, способный окислять связанный с ним кардиолипин во внутренней митохондриальной мембране [54]. Окисление катализируется благодаря пероксидазной активности цитохрома *c*. Образование АФК происходит и при стимуляции внешнего пути апоптоза воздействием на TNF-рецепторы для формирования сигнала, индуцирующего апоптоз [57]. Одним из объяснений этому служит расщепление каспазами протеинкиназы δ и последующая активация NADPH оксидазного комплекса (NOX4) [58]. Еще одним источником АФК в митохондриях апоптотических клеток является белок p66Shs, окислительно-восстановительный фермент, который использует восстановительные эквиваленты, полученные из митохондриальной цепи переноса электронов в результате окисления цитохрома *c* с образованием H_2O_2 в межмембранном пространстве [59]. Частично этот фермент локализован в митохондриях, где образует комплекс с митохондриальным Hsp70. При индукции апоптоза диссоциация этого комплекса сопровождается высвобождением мономерного p66Shc и его взаимодействие с цитохромом *c* ведет к образованию перекиси водорода. Редокс-дефектные мутанты p66Shc не способны стимулировать образование митохондриальных АФК и повреждение митохондрий *in vitro* или опосредовать митохондриальный апоптоз *in vivo*. В подобных ситуациях образование АФК служит своеобразной петлей амплификации, ускоряя гибель клетки.

Регулятором уровня АФК в клетке косвенно является транскрипционный фактор p53. Он не только отвечает за индукцию апоптоза, но и защищает геном от АФК. К примеру, одной из мишеней p53 является ген глютаминазы, которая катализирует превращение глютамина в предшественник антиоксиданта глутатиона – глутамат. Это способствует повышению содержания глутатиона в клетках, что снижает уровень АФК [60]. Подавление p53 стимулирует окислительное повреждение ДНК, повышает образование мутаций и нестабильность генома [61]. Таким

образом, при утрате p53 либо вследствие его мутации клетки могут подвергаться повышенному риску малигнизации, что и наблюдается в подавляющем большинстве опухолей. Однако в некоторых случаях активация p53, напротив, способствуют образованию АФК. Так, в клетках, чувствительных к зависимому от p53 апоптозу, стимуляция гибели сопровождалась образованием свободных радикалов, тогда как в резистентных клетках подобная активация не наблюдалась [62]. Одним из объяснений этому является тот факт, что p53 может оказывать влияние на потребление кислорода митохондриями, поддерживая активность цитохромоксидазы, одного из центров утечки электронов из дыхательной цепи [63].

В зависимости от концентрации АФК могут по-разному влиять на каталитическую активность каспаз – основных ферментов апоптоза. Так, в умеренных концентрациях перекись водорода активирует каспазы в результате стимуляции митохондриального пути апоптоза, но при увеличении ее концентрации возможна инактивация этих ферментов вследствие окисления цистеиновых остатков в каталитическом центре, что приведет к гибели клеток по некротическому типу [64]. Более того, избыточная выработка АФК может привести к изменению pH в цитозоле клетки, что снизит каталитическую активность каспаз [65]. В ряде исследований показано, что антиапоптотические белки семейства Bcl-2 обладают выраженной антиоксидантной активностью. Так, стимуляция экспрессии белка Bcl-2 защищает клетку от перекисного окисления липидов и тиолов, вызванных перекисью водорода [66]. Это, наряду с их способностью связывать проапоптотические белки, способствует предотвращению апоптоза.

Окислительный стресс играет первостепенную роль в инициации ферроптоза, одной из форм ПГК, зависящей от присутствия ионов железа и характеризующейся накоплением перекисей липидов. Ферроптоз связан с патологической клеточной гибелью при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, инсульт, внутримозговое кровоизлияние, черепно-мозговая травма и им подобные [67]. Генетически и биохимически ферроптоз отличается от других форм регулируемой гибели клеток, в частности от апоптоза. Поскольку в ферроптозе весомую роль играют продукты перекисного окисления липидов, судьба клетки будет определяться ее антиоксидантным статусом. Гибель опухолевых клеток по механизму ферроптоза может быть вызвана подавлением зависимой от глутатиона антиоксидантной защиты, в частности глутатионпероксидазы 4 (GPX4), либо депривацией антиоксидантов, тогда как повышенная экспрессия этого фермента может внести вклад в развитие опухоли. Так, повышенное содержание GPX4 в клетках диффузной В-клеточной лимфомы наблюдалось у 35% пациентов, а клетки с повышенной экспрессией GPX4 были устойчивы к гибели, вызванной накоплением АФК [68]. Снижение содержания или ингибирование GPX4 также может быть вовлечено, при определенных обстоятельствах, в индукцию апоптоза [69] и некроптоза [70], что говорит о взаимопроникновении метаболических путей, регулирующих эти формы гибели клеток.

АФК способны стимулировать аутофагию, естественный процесс утилизации содержимого клетки – органелл и макромолекул, в клеточных компартментах, образующихся при слиянии аутофагосом с лизосомами при стрессорных воздействиях, таких как ишемия с последующей реперфузией, состояние гипоксии в опухолях, недостаток питательных веществ. Результатом прогрессирующей аутофагии может быть как гибель клеток, так и их выживание. Взаимосвязь между АФК и аутофагией проявляется в двух аспектах – индукция аутофагии в условиях окислительного стресса и подавление образования АФК при стимуляции аутофагии [71]. Аутофагия, направленная на митохондрии – митофагия, является своего рода контролем качества митохондрий в клетке. Митофагия позволяет клетке удалять поврежденные митохондрии либо органеллы, представляющие опасность для клетки, к примеру, генерирующие активные формы кислорода. Стимуляция аутофагии и митофагии может снизить эффект противоопухолевых препаратов, поскольку поврежденные митохондрии с пермеабилизованной внешней мембраной и генерирующие АФК будут элиминироваться [72]. Это следует учитывать при выборе противоопухолевого препарата, а также не исключает применение ингибиторов аутофагии для усиления противоопухолевого эффекта.

АФК И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ

Способность АФК вызывать гибель клеток используется в противоопухолевой терапии [73]. Так, в настоящее время проводится большое количество исследований по изучению эффективности использования натуральных препаратов, способствующих стимуляции гибели клеток за счет продуцирования АФК. Было установлено, что добавление к клеткам рака простаты аурикулазина – препарата, вызывающего выработку свободных радикалов в клетках – приводит к

индукции апоптоза. Исследователи наблюдали интенсивную фрагментацию ДНК опухолевых клеток, а также расщепление в них мишени каспазы-3 белка–PARP, увеличение содержания белка AIF, а также смещение баланса между белками Bcl-2 семейства в сторону проапоптотических [74]. Обработка клеток колоректального рака человека гиненозидами (относятся к семейству тритерпеновых гликозидов) также приводила к повышенной продукции АФК, в результате стимулировался не только апоптоз, но и аутофагия. Более того, добавление этого агента вызывало задержку клеточного цикла в G0/G1-фазе, что вело к ингибированию роста опухоли [75].

На данный момент появляется все больше исследований возможностей целенаправленного воздействия на клетки злокачественных опухолей. Так, была выдвинута модель, предполагающая использование молекул, стимулирующих выработку АФК исключительно в клетках малигнизированных тканей [76]. Появился целый ряд соединений под общим названием митокаины (mitocans, что является сочетанием слов MITOchondria и CANcer) [77]. Одним из таких соединений является производное альфа-токоферола – альфа-токоферил сукцинат. Связываясь с комплексом II дыхательной цепи митохондрий, он стимулирует утечку электронов и образование АФК. Благодаря воздействию на митохондрии, альфа-токоферил сукцинат способен вызывать гибель клеток, резистентных к терапии, в частности в гипоксических условиях [78], а также вследствие амплификации протоонкогена *MYCN* [79]. Данный метод может быть применим на практике в сочетании с химиотерапией, что позволит увеличить эффект терапии в целом, а также снизить побочные эффекты противоопухолевых препаратов. На генерации АФК основан метод фотодинамической терапии опухолей. Фотосенсибилизаторы, к примеру, производные порфиринов, конъюгированные с глюкозой [80], способны селективно накапливаться в ткани опухолей и при локальном воздействии облучения определенной длины волны генерировать АФК, в частности синглетный кислород, стимулируя гибель опухолевых клеток.

Таким образом, стимуляция окислительного стресса в опухолевых клетках является эффективной стратегией их элиминации. К сожалению, при этом могут страдать и здоровые ткани, поэтому поиск путей их защиты является насущным вопросом противоопухолевой терапии.

Действие препаратов, традиционно используемых в противоопухолевой терапии, нередко связано с образованием АФК в количестве, превышающем защитный порог опухолевой клетки, что вызывает ее гибель. Таким свойством обладает, к примеру, доксорубицин, соединение, повреждающее ДНК, но при этом стимулирующее образование АФК [81]. Аналогичным действием обладают и другие противоопухолевые препараты, такие как цисплатин и этопозид. В этой ситуации использование антиоксидантов защитит опухолевую клетку от разрушительного действия АФК, что может существенно снизить терапевтический эффект [82]. Однако не все вещества, обладающие антиоксидантной активностью, способны защищать клетки от гибели; некоторые антиоксиданты могут, зачастую, способствовать развитию окислительного стресса и запуску каскада реакций, приводящих к апоптозу. Так, добавление галловой кислоты – природного растительного фенола с антиоксидантной активностью – к клеткам острого промиелоцитарного лейкоза HL-60RG вызывало апоптоз на фоне накопления перекиси водорода и супероксидного радикала. Следует отметить, что продукция АФК была вызвана не в результате антиоксидантной активности вещества, а вследствие нарушения гомеостаза клетки по Ca^{2+} [83]. Другой пример, диферулоилметан, или куркумин, – вещество полифенольной структуры, часто применяющееся в качестве приправы и красителя в пищевых продуктах. Как отмечалось, куркумин обладает выраженной антиоксидантной активностью: так, он способен предотвратить развитие окислительного стресса в эпителиальных клетках сосудов [84]. Однако недавние исследования подтверждают также наличие у куркумина и прооксидантной активности [85]. Так, куркумин индуцировал апоптоз в клетках острого промиелоцитарного лейкоза, а воздействие таких антиоксидантов, как NAC, L-аскорбиновая кислота, токоферол, каталаза, SOD, снижало гибель клеток, что свидетельствует о свободно-радикальном механизме индукции апоптоза [86]. Совместное добавление галловой кислоты и куркумина к клеткам рака молочной железы продемонстрировало положительные терапевтические эффекты, что было связано с генерацией АФК в опухолевых клетках, истощением в них глутатиона, повышением содержания проапоптотического белка Bax, снижением содержания антиапоптотического белка Bcl-2, и сопровождалось процессингом каспазы-3 и ее активацией [85]. Некоторые соединения, в частности, витамин С, обладающие выраженной антиоксидантной активностью, при определенных концентрациях способны индуцировать апоптоз, выступая в качестве прооксиданта [87]. Так, добавление витамина С повышало содержание TRAIL-лиганда,

участвующего в реализации рецептор-зависимого сигнального пути апоптоза, а также активации проапоптотического белка Bax и каспаз. Исходя из этого, можно заключить, что некоторые антиоксиданты, в силу своих структурных особенностей и в зависимости от концентрации, способны стимулировать продукцию АФК, а также увеличивать восприимчивость клеток к проапоптотическим воздействиям. Следует отметить, что эффективность используемого химиотерапевтического препарата может быть различной в зависимости от метаболического состояния опухоли. Так, снижение антиоксидантного статуса клетки нейробластомы депривацией глютамина подавляло апоптоз, вызванный этопозидом, но при этом стимулировало гибель, вызванную цисплатином. В условиях депривации глютамина подавление апоптоза в клетках, обработанных этопозидом, было результатом снижения экспрессии транскрипционного фактора p53. Тогда как в случае цисплатина стимуляция апоптоза объяснялась активацией капазы-8, вследствие снижения уровня ее ингибитора FLIP-S [88].

К сожалению, противоопухолевая терапия, основанная на выработке чрезмерного количества АФК, приводит к гибели не только опухолевых, но и нормальных клеток. Так, развитие доксорубицин-опосредованной кардиомиопатии и повреждение кардиомиоцитов является одним из основных побочных эффектов лечения данным химиотерапевтическим препаратом [89]. В этих условиях использование антиоксидантов позволило бы защитить здоровые ткани. Как было сказано выше, противоопухолевое действие доксорубицина основано как на стимуляции экспрессии p53 вследствие повреждения ДНК, так и на индукции окислительного стресса. Сопоставление механизмов индукции апоптоза в нормальных клетках (клетки эндотелия и кардиомиоциты) и опухолевых клетках (клетки тератокарциномы яичника PA-1 и рака молочной железы MCF-7) показало, что в эндотелиальных клетках активация каспазы-3, опосредованная АФК, предшествовала активации p53, тогда как в опухолевых клетках доксорубицин вызывал раннюю активацию p53, что вело к активации каспазы-3 и фрагментации ДНК. По мнению авторов, активация p53 в нормальных клетках не столь существенна для индукции апоптоза по сравнению с опухолевыми клетками. Действительно, ингибитор p53, пифитрин-α, полностью подавлял активацию p53 как в опухолевых, так и в нормальных клетках, однако при этом подавление апоптоза наблюдалось лишь в клетках опухоли. Напротив, добавка в качестве антиоксидантов металлопорфиринов либо стимуляция экспрессии глутатионперокидазы подавляла апоптоз в эндотелиальных клетках и кардиомиоцитах, но не в клетках опухоли. Обнаруженное механистическое различие в действии доксорубицина на нормальные и опухолевые клетки позволит разработать новые препараты, способные селективно подавлять токсические эффекты доксорубицина, не затрагивая его противоопухолевые эффекты [90]. Так, сочетанная терапия клеток рака молочной железы с использованием доксорубицина и каротиноидов, обладающих антиоксидантной активностью, продемонстрировала положительные эффекты – каротиноиды способствовали увеличению цитотоксичности в опухолевых клетках без повышения таковой в нормальных [91]. Таким образом, добавление в ряде случаев антиоксидантов может предотвратить накопление повреждений в клетках окружающих неопухолевых тканей, не влияя при этом на чувствительность опухолевых клеток к противоопухолевой терапии. Исходя из этого, к выбору антиоксидантов для защиты нормальных тканей в условиях химиотерапии следует подходить с осторожностью.

АНТИОКСИДАНТЫ И ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ: ЗА И ПРОТИВ

В последние десятилетия в лечении онкологических заболеваний широко применяют лучевую (или радиационную) терапию. Ее целью является стимуляция повреждений в ДНК опухолевых клеток, которые в большей степени чувствительны к облучению из-за их предрасположенности к неконтролируемому активному делению. Радиация может воздействовать на клетки напрямую, вызывая повреждение молекул ДНК, а также косвенно через накопление АФК, образующихся в результате воздействия излучения на молекулы воды. Это ведет к накоплению гидроксильных радикалов, обладающих наиболее разрушительной силой, супероксидов радикалов и других окислителей, в том числе перекиси водорода. Так как антиоксиданты способны нейтрализовать действие АФК в клетках, неоднократно было высказано предположение, что употребление антиоксидантов в качестве пищевых добавок во время лучевой терапии может вызвать устойчивость опухолевых клеток к радиации [92], в частности, было установлено, что витамин Е снижает действие облучения как на нормальные, так и на злокачественные клетки [93]. В клетках острого миелоидного лейкоза, к которым добавлялся витамин С, также наблюдалось снижение апоптоза, индуцированного воздействием радиационного из-

Рис. 3. Умеренно повышенное образование АФК, сбалансированное работой антиоксидантных систем клетки, поддерживает пролиферацию опухолевых клеток и играет важную роль в процессах метастазирования. Неконтролируемое образование АФК под действием противоопухолевых препаратов в количестве, превышающем мощности защитных систем клетки, будет вызывать гибель опухолевых клеток. Применение антиоксидантов способно сдерживать как пролиферацию, так и метастазирование. Однако использование антиоксидантов в процессе противоопухолевой терапии будет подавлять гибель клеток, снижая ее эффективность

лучения [94]. При этом во многих исследованиях отмечаются отрицательные последствия использования антиоксидантов при лучевой терапии в целом [82]. Так, например, прием антиоксидантов во время радиационной терапии рака молочной железы снижал общую выживаемость, а также повышал вероятность рецидивов заболевания [95]. Эти работы демонстрируют, что, несмотря на способность уменьшать побочные эффекты, прием высоких доз антиоксидантов может привести к снижению эффективности лучевой терапии в целом.

Несмотря на это, предполагается, что антиоксиданты могут снижать интенсивность радиационного воздействия на нормальные клетки, не повышая устойчивости опухолевых клеток к излучению. Так, было показано, что добавление витамина Е в условиях лучевой терапии предотвращает накопление повреждений в нормальных клетках, усиливая воздействие излучения на опухолевые клетки, в результате чего подавляется рост опухоли [96]. Недавние исследования демонстрируют положительные эффекты от внутривенного приема аскорбиновой кислоты (витамина С) во время лучевой терапии при аденокарциноме поджелудочной железы. Было установлено, что витамин С усиливает воздействие радиации на опухолевые клетки, защищая клетки немалигнизированных тканей от радиационного воздействия [97].

Снижение побочных эффектов лучевой терапии в случае приема пациентами антиоксидантов было продемонстрировано в целом ряде работ [98, 99]. Одним из последствий облучения является хронический лучевой проктит – воспаление слизистой оболочки прямой кишки, часто развивающееся после тазового облучения. Показано, что витамины Е и С способны снизить данный побочный эффект после лучевой терапии; в частности, пациенты с раком простаты и гинекологическими опухолями, принимающие данные антиоксиданты в течение года, сообщили об устойчивом снижении симптомов заболеваний [98]. Еще одним частым осложнением после облучения брюшной или тазовой полости является радиационный энтерит. Было также установлено, что добавление антиоксидантов приводит к снижению повреждения клеток, вызванного накоплением в них АФК. Совместный прием витамина Е и пентоксифиллина (не обладающего выраженными антиоксидантными свойствами) вызывал регрессию фиброза, индуцированного радиацией [100].

В целом отмечается, что пациенты, принимающие антиоксиданты, лучше переносят лучевую терапию [101]. Это может быть связано с тем, что в тканях, подверженных воздействию радиации, наблюдается истощение пула некоторых антиоксидантов; в частности, было показано снижение содержания витаминов С и Е в тканях после облучения всего тела рентгеновскими лучами [102]. Более того, с возрастом выработка эндогенных антиоксидантов в тканях снижается, а также уменьшается способность клеток к репарации ДНК. Исследование антиоксидантных свойств плазмы людей в возрасте от 30 до 80 лет продемонстрировала обратную зависимость от возраста [103]. Таким образом, можно предположить, что добавление антиоксидантов во время лучевой терапии позволит восполнить их недостаток в тканях, повышая устойчивость неопухолевых клеток к радиационному воздействию.

Антиоксиданты способны подавлять пролиферативные сигналы в опухолевых клетках, тем самым предотвращая развитие и метастазирование опухолей. Однако в условиях терапии опухоли с использованием соединений, стимулирующих окислительный стресс, антиоксиданты будут снижать эффективность терапии (рис. 3).

В настоящее время проводится множество исследований, целью которых является дать окончательный ответ на вопрос, является ли прием антиоксидантов в терапии злокачественных опухолей целесообразным и безопасным. Несмотря на большое количество уже имеющихся научных данных, спрогнозировать путь, по которому будет реализовываться ответ клеток на добавление к ним того или иного антиоксиданта, по-прежнему является сложной задачей. Механизм, согласно которому антиоксидант будет действовать на клетки, зависит не только от его природы и концентрации, но и от этиологии клеток, которые подвергаются воздействию.

Именно поэтому в основе успешного использования антиоксидантов в терапии опухолей должен лежать индивидуальный подход в каждом отдельном случае заболевания.

Благодарности. Авторы выражают благодарность проф. Б.Д. Животовскому за помощь в работе над рукописью, ценные замечания и предложения. Мы приносим свои извинения тем авторам, чьи публикации не могли быть процитированы в силу ограниченного объема нашего обзора.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 19-14-00122). Работа в лабораториях авторов также поддержана грантами РФФИ (20-015-00105), Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) онкологическими фондами.

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

1. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
2. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018, *Cell Death Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
3. Halliwell, B. (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition, *Mutat. Res.*, **443**, 37-52, doi: 10.1016/s1383-5742(99)00009-5.
4. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Murphy, A. N., and Starkov, A. A. (2015) Mitochondrial ROS metabolism: 10 years later, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 517-531, doi: 10.1134/S0006297915050028.
5. Gaweska, H., and Fitzpatrick, P. F. (2011) Structures and meanism of the monoamine oxidase family, *Biomol. Concepts*, **2**, 365-377, doi: 10.1515/BMC.2011.030.
6. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., et al. (2018) Oxidative stress, aging and diseases, *Clin. Interv. Aging*, **13**, 757-772, doi: 10.2147/CIA.S158513.
7. Schroder, K., Zhang, M., Benkhoff, S., Mieth, A., Pliquett, R., et al. (2012) Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase, *Circ. Res.*, **110**, 1217-1225, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.
8. Meng, X. M., Ren, G. L., Gao, L., Yang, Q., Li, H. D., et al. (2018) NADPH oxidase 4 promotes cisplatin-induced acute kidney injury *via* ROS-mediated programmed cell death and inflammation, *Lab. Invest.*, **98**, 63-78, doi: 10.1038/labinvest.2017.120.
9. Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., and Keightley, P. D. (2008) Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*, *PLoS Biol.*, **6**, e204, doi: 10.1371/journal.pbio.0060204.
10. Elchuri, S., Oberley, T. D., Qi, W., Eisenstein, R. S., Jackson Roberts, L., et al. (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life, *Oncogene*, **24**, 367-380, doi: 10.1038/sj.onc.1208207.
11. Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., et al. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nat. Genet.*, **11**, 376-381, doi: 10.1038/ng1295-376.
12. Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (1995) Activation of an H2O2-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1, *J. Biol. Chem.*, **270**, 30334-30338, doi: 10.1074/jbc.270.51.30334.
13. Meier, B., Radeke, H. H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., and Habermehl, G. G. (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha, *Biochem. J.*, **263**, 539-545, doi: 10.1042/bj2630539.
14. Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D. A. (2016) Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2977-2992, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
15. Kim, S. Y., Park, C., Jang, H. J., Kim, B. O., Bae, H. W., et al. (2019) Antibacterial strategies inspired by the oxidative stress and response networks, *J. Microbiol.*, **57**, 203-212, doi: 10.1007/s12275-019-8711-9.
16. Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P., Cheng, Y. L., et al. (2018) Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury, *Cell. Physiol. Biochem.*, **46**, 1650-1667, doi: 10.1159/000489241.
17. Rodic, S., and Vincent, M. D. (2018) Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype, *Int. J. Cancer*, **142**, 440-448, doi: 10.1002/ijc.31069.
18. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts, *Science*, **275**, 1649-1652, doi: 10.1126/science.275. 5306.1649.
19. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability, *Mol. Cell*, **9**, 1031-1044, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00520-8.
20. Hole, P. S., Pearn, L., Tonks, A. J., James, P. E., Burnett, A. K., Darley, R. L., and Tonks, A. (2010) Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells, *Blood*, **115**, 1238-1246, doi: 10.1182/blood-2009-06-222869.
21. Semenza, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 721-732, doi: 10.1038/nrc1187.
22. Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., and Schumacker, P. T. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O_2 sensing, *J. Biol. Chem.*, **275**, 25130-25138, doi: 10.1074/jbc.M001914200.
23. Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., et al. (2019) Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements, *Biomolecules*, **9**, doi: 10.3390/biom9110735.
24. Kanbagli, O., Ozdemirler, G., Bulut, T., Yamaner, S., Aykac-Toker, G., and Uysal, M. (2000) Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal ade-

nocarcinoma tissues, *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 1258-1263, doi: 10.1111/j.1349-7006.2000.tb00912.x.
25. Cobbs, C. S., Levi, D. S., Aldape, K., and Israel, M. A. (1996) Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors, *Cancer Res.*, **56**, 3192-3195.
26. Wang, M., Kirk, J. S., Venkataraman, S., Domann, F. E., Zhang, H. J., et al. (2005) Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor, *Oncogene*, **24**, 8154-8166, doi: 10.1038/sj.onc.1208986.
27. Nakata, T., Suzuki, K., Fujii, J., Ishikawa, M., Tatsumi, H., et al. (1992) High expression of manganese superoxide dismutase in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancer and increased serum levels in the tumor-bearing rats, *Carcinogenesis*, **13**, 1941-1943, doi: 10.1093/carcin/13.10.1941.
28. Nunes, S. C., and Serpa, J. (2018) Glutathione in varian cancer: a double-edged sword, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19071882.
29. Chan, J. M., Darke, A. K., Penney, K. L., Tangen, C. M., et al. (2016) Selenium- or vitamin E-related gene variants, interaction with supplementation, and risk of high-grade prostate cancer in select, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **25**, 1050-1058, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0104.
30. Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., et al. (2006) Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer, *PLoS Med.*, **3**, e420, doi: 10.1371/journal.pmed.0030420.
31. Oberley, L. W. (2001) Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase, *Antioxid. Redox Signal.*, **3**, 461-472, doi: 10.1089/15230860152409095.
32. Wang, J. Y., Wang, X., Wang, X. J., Zheng, B. Z., Wang, Y., Wang, X., and Liang, B. (2018) Curcumin inhibits the growth via Wnt/beta-catenin pathway in non-small-cell lung cancer cells, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22**, 7492-7499, doi: 10.26355/eurrev_201811_16290.
33. 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.
34. Knock, G. A., and Ward, J. P. (2011) Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1531-1547, doi: 10.1089/ars.2010.3614.
35. Natarajan, K., Gottipati, K. R., Berhane, K., Samten, B., Pendurthi, U., and Boggaram, V. (2016) Proteases and oxidant stress control organic dust induction of inflammatory gene expression in lung epithelial cells, *Respir. Res.*, **17**, 137, doi: 10.1186/s12931-016-0455-z.
36. Sagun, K. C., Cárcamo, J. M., and Golde, D. W. (2006) Antioxidants prevent oxidative DNA damage and cellular transformation elicited by the over-expression of c-MYC, *Mutat. Res.*, **593**, 64-79, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.06.015.
37. Gordan, J. D., Thompson, C. B., and Simon, M. C. (2007) HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation, *Cancer Cell*, **12**, 108-113, doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.006.
38. Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., and Matias-Guiu, X. (2005) NF-κB in development and progression of human cancer, *Virchows Arch.*, **446**, 475-482, doi: 10.1007/s00428-005-1264-9.
39. Johnson, J., Thijssen, B., McDermott, U., Garnett, M., Wessels, L. F., and Bernards, R. (2016) Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer, *Oncogene*, **35**, 4829-4835, doi: 10.1038/onc.2016.32.
40. Nevins, J. R. (2001) The Rb/E2F pathway and cancer, *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 699-703, doi: 10.1093/hmg/10.7.699.
41. De Jager, S. M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., and Murray, J. A. (2005) The developmental context of cell-cycle control in plants, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **16**, 385-396, doi: 10.1016/j.semcdb.2005.02.004.
42. Bakshi, S., Bergman, M., Dovrat, S., and Grossman, S. (2004) Unique natural antioxidants (NAOs) and derived purified components inhibit cell cycle progression by downregulation of ppRb and E2F in human PC3 prostate cancer cells, *FEBS Lett.*, **573**, 31-37, doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.101.
43. Henry, D., Brumaire, S., and Hu, X. (2019) Involvement of pRb-E2F pathway in green tea extract-induced growth inhibition of human myeloid leukemia cells, *Leuk. Res.*, **77**, 34-41, doi: 10.1016/j.leukres.2018.12.014.
44. Sayin, V. I., Ibrahim, M. X., Larsson, E., Nilsson, J. A., Lindahl, P., and Bergo, M. O. (2014) Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 221ra215, doi: 10.1126/scitranslmed.3007653.
45. Wiel, C., Le Gal, K., Ibrahim, M. X., Jahangir, C. A., Kashif, M., et al. (2019) BACH1 stabilization by antioxidants stimulates lung cancer metastasis, *Cell*, **178**, 330-345.e322, doi: 10.1016/j.cell.2019.06.005.
46. Lignitto, L., LeBoeuf, S. E., Homer, H., Jiang, S., Askenazi, M., et al. (2019) Nrf2 activation promotes lung cancer metastasis by inhibiting the degradation of Bach1, *Cell*, **178**, 316-329.e318, doi: 10.1016/j.cell.2019.06.003.
47. Kumari, S., Badana, A. K., G, Mohan, M., Shailender, G., and Malla, R. (2018) Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival, *Biomark. Insights*, **13**, 1177271918755391, doi: 10.1177/1177271918755391.
48. Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2008) Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.*, **18**, 165-173, doi: 10.1016/j.tcb.2008.01.006.
49. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 929-935, doi: 10.1128/mcb.20.3.929-935.2000.
50. Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 639-647, doi: 10.1016/j.bbabio.2006.03.016.
51. Hunter, D. R., and Haworth, R. A. (1979) The Ca^{2+}-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 453-459, doi: 10.1016/0003-9861(79)90371-0.
52. McStay, G. P., Clarke, S. J., and Halestrap, A. P. (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore, *Biochem. J.*, **367**, 541-548, doi: 10.1042/BJ20011672.
53. Neuzil, J., Wang, X. F., Dong, L. F., Low, P., and Ralph, S. J. (2006) Molecular mechanism of "mitocan"-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins, *FEBS Lett.*, **580**, 5125-5129, doi: 10.1016/j.febslet.2006.05.072.
54. Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1259-1263, doi: 10.1073/pnas.241655498.
55. Kagan, V. E., Bayir, H. A., Belikova, N. A., Kapralov, O., Tyurina, Y. Y., et al. (2009) Cytochrome *c*/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1439-1453, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.
56. Cai, J., and Jones, D. P. (1999) Mitochondrial redox signaling during apoptosis, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 327-334, doi: 10.1023/a:1005423818280.
57. Cabeca, T. K., de Mello Abreu, A., Andrette, R., de Souza Lino, V., Morale, M. G., et al. (2019) HPV-mediated resistance to TNF and TRAIL is characterized by global alterations in apoptosis regulatory factors, dysregulation of death receptors, and induction of ROS/RNS, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20010198.

58. Choi, K., Ryu, S. W., Song, S., Choi, H., Kang, S. W., and Choi, C. (2010) Caspase-dependent generation of reactive oxygen species in human astrocytoma cells contributes to resistance to TRAIL-mediated apoptosis, *Cell. Death Differ.*, **17**, 833-845, doi: 10.1038/cdd.2009.154.
59. Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., et al. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis, *Cell*, **122**, 221-233, doi: 10.1016/j.cell.2005.05.011.
60. Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z. (2010) Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7455-7460, doi: 10.1073/pnas.1001006107.
61. Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., and Chumakov, P. M. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor, *Nat. Med.*, **11**, 1306-1313, doi: 10.1038/nm1320.
62. Johnson, T. M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A., and Finkel, T. (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11848-11852, doi: 10.1073/pnas.93.21.11848.
63. Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., et al. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration, *Science*, **312**, 1650-1653, doi: 10.1126/science.1126863.
64. Hampton, M. B., and Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis, *FEBS Lett.*, **414**, 552-556, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01068-5.
65. Akram, S., Teong, H. F., Fliegel, L., Pervaiz, S., and Clement, M. V. (2006) Reactive oxygen species-mediated regulation of the Na^+-H^+ exchanger 1 gene expression connects intracellular redox status with cells' sensitivity to death triggers, *Cell Death Differ.*, **13**, 628-641, doi: 10.1038/sj.cdd.4401775.
66. Pohl, S. O., Agostino, M., Dharmarajan, A., and Pervaiz, S. (2018) Cross talk between cellular redox state and the anti-apoptotic protein Bcl-2, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1215-1236, doi: 10.1089/ars.2017.7414.
67. Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., et al. (2017) Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology and disease, *Cell*, **171**, 273-285, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
68. Kinowaki, Y., Kurata, M., Ishibashi, S., Ikeda, M., Tatsuzawa, A., et al. (2018) Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma, *Lab. Invest.*, **98**, 609-619, doi: 10.1038/s41374-017-0008-1.
69. Lubos, E., Loscalzo, J., and Handy, D. E. (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1957-1997, doi: 10.1089/ars.2010.3586.
70. Canli, O., Alankus, Y. B., Grootjans, S., Vegi, N., Hultner, L., et al. (2016) Glutathione peroxidase 4 prevents necroptosis in mouse erythroid precursors, *Blood*, **127**, 139-148, doi: 10.1182/blood-2015-06-654194.
71. Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., and Zhang, Q. (2015) ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms, *Cell Mol. Neurobiol.*, **35**, 615-621, doi: 10.1007/s10571-015-0166-x.
72. Abdrakhmanov, A., Kulikov, A. V., Luchkina, E. A., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2019) Involvement of mitophagy in cisplatin-induced cell death regulation, *Biol. Chem.*, **400**, 161-170, doi: 10.1515/hsz-2018-0210.
73. Raza, M. H., Siraj, S., Arshad, A., Waheed, U., Aldakheel, F., Alduraywish, S., and Arshad, M. (2017) ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **143**, 1789-1809, doi: 10.1007/s00432-017-2464-9.
74. Cho, H. D., Lee, J. H., Moon, K. D., Park, K. H., Lee, M. K., and Seo, K. I. (2018) Auriculasin-induced ROS causes prostate cancer cell death via induction of apoptosis, *Food Chem. Toxicol.*, **111**, 660-669, doi: 10.1016/j.fct.2017.12.007.
75. Wu, Q., Deng, J., Fan, D., Duan, Z., Zhu, C., Fu, R., and Wang, S. (2018) Ginsenoside Rh4 induces apoptosis and autophagic cell death through activation of the ROS/JNK/p53 pathway in colorectal cancer cells, *Biochem. Pharmacol.*, **148**, 64-74, doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.004.
76. Nicco, C., and Batteux, F. (2017) ROS modulator molecules with therapeutic potential in cancers treatments, *Molecules*, **23**, doi: 10.3390/molecules23010084.
77. Biasutto, L., Dong, L. F., Zoratti, M., and Neuzil, J. (2010) Mitochondrially targeted anti-cancer agents, *Mitochondrion*, **10**, 670-681, doi: 10.1016/j.mito.2010.06.004.
78. Kulikov, A. V., Vdovin, A. S., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2014) Targeting mitochondria by alpha-tocopheryl succinate overcomes hypoxia-mediated tumor cell resistance to treatment, *Cell Mol. Life Sci.*, **71**, 2325-2333, doi: 10.1007/s00018-013-1489-8.
79. Kruspig, B., Nilchian, A., Bejarano, I., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2012) Targeting mitochondria by alpha-tocopheryl succinate kills neuroblastoma cells irrespective of MycN oncogene expression, *Cell Mol. Life Sci.*, **69**, 2091-2099, doi: 10.1007/s00018-012-0918-4.
80. Ito, H., and Matsui, H. (2016) Mitochondrial reactive oxygen species and photodynamic therapy, *Laser Ther.*, **25**, 193-199, doi: 10.5978/islsm.16-OR-15.
81. Ubezio, P., and Civoli, F. (1994) Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 509-516, doi: 10.1016/0891-5849(94)90129-5.
82. Lawenda, B. D., Kelly, K. M., Ladas, E. J., Sagar, S. M., Vickers, A., and Blumberg, J. B. (2008) Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J. Natl. Cancer Inst.*, **100**, 773-783, doi: 10.1093/jnci/djn148.
83. Isuzugawa, K., Inoue, M., and Ogihara, Y. (2001) Ca^{2+}-dependent caspase activation by gallic acid derivatives, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 844-847, doi: 10.1248/bpb.24.844.
84. Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., and Green, C. J. (2000) Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1303-1312, doi: 10.1016/s0891-5849(00)00294-x.
85. Moghtaderi, H., Sepehri, H., Delphi, L., and Attari, F. (2018) Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231, *Bioimpacts*, **8**, 185-194, doi: 10.15171/bi.2018.21.
86. Kuo, M. L., Huang, T. S., and Lin, J. K. (1996) Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1317**, 95-100, doi: 10.1016/s0925-4439(96)00032-4.
87. Sant, D. W., Mustafi, S., Gustafson, C. B., Chen, J., Slingerland, J. M., and Wang, G. (2018) Vitamin C promotes apoptosis in breast cancer cells by increasing TRAIL expression, *Sci. Rep.*, **8**, 5306, doi: 10.1038/s41598-018-23714-7.
88. Valter, K., Chen, L., Kruspig, B., Maximchik, P., Cui, H., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2017) Contrasting effects of glutamine deprivation on apoptosis induced by conventionally used anticancer drugs, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1864**, 498-506, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.12.016.
89. Renu, K., Abilash, V., G., Tirupathi Pichiah, P. B., and Arunachalam, S. (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – an update, *Eur. J.*

Pharmacol., **818**, 241-253, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043.
90. Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., and Kalyanaraman, B. (2004) Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of $H(_2)O(_2)$- and p53-dependent pathways, *J. Biol. Chem.*, **279**, 25535-25543, doi: 10.1074/jbc.M400944200.
91. Vijay, K., Sowmya, P. R., Arathi, B. P., Shilpa, S., Shwetha, H. J., Raju, M., Baskaran, V., and Lakshminarayana, R. (2018) Low-dose doxorubicin with carotenoids selectively alters redox status and upregulates oxidative stress-mediated apoptosis in breast cancer cells, *Food Chem. Toxicol.*, **118**, 675-690, doi: 10.1016/j.fct.2018.06.027.
92. D'Andrea, G. M. (2005) Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided, *CA Cancer J. Clin.*, **55**, 319-321, doi: 10.3322/canjclin.55.5.319.
93. Sakamoto, K., and Sakka, M. (1973) Reduced effect of irradiation on normal and malignant cells irradiated *in vivo* in mice pretreated with vitamin E, *Br. J. Radiol.*, **46**, 538-540, doi: 10.1259/0007-1285-46-547-538.
94. Witenberg, B., Kletter, Y., Kalir, H. H., Raviv, Z., Fenig, E., et al. (1999) Ascorbic acid inhibits apoptosis induced by X irradiation in HL60 myeloid leukemia cells, *Radiat. Res.*, **152**, 468-478.
95. Jung, A. Y., Cai, X., Thoene, K., Obi, N., Jaskulski, S., et al. (2019) Antioxidant supplementation and breast cancer prognosis in postmenopausal women undergoing chemotherapy and radiation therapy, *Am. J. Clin. Nutr.*, **109**, 69-78, doi: 10.1093/ajcn/nqy223.
96. Prasad, K. N., Kumar, B., Yan, X. D., Hanson, A. J., and Cole, W. C. (2003) Alpha-tocopheryl succinate, the most effective form of vitamin E for adjuvant cancer treatment: a review, *J. Am. Coll. Nutr.*, **22**, 108-117, doi: 10.1080/07315724.2003.10719283.
97. Alexander, M. S., Wilkes, J. G., Schroeder, S. R., Buettner, G. R., Wagner, B. A., et al. (2018) Pharmacologic ascorbate reduces radiation-induced normal tissue toxicity and enhances tumor radiosensitization in pancreatic cancer, *Cancer Res.*, **78**, 6838-6851, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1680.
98. Kennedy, M., Bruninga, K., Mutlu, E. A., Losurdo, J., Choudhary, S., and Keshavarzian, A. (2001) Successful and sustained treatment of chronic radiation proctitis with antioxidant vitamins E and C, *Am. J. Gastroenterol.*, **96**, 1080-1084, doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03742.x.
99. Moss, R. W. (2007) Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integr. Cancer Ther.*, **6**, 281-292, doi: 10.1177/1534735407305655.
100. Delanian, S., Balla-Mekias, S., and Lefaix, J. L. (1999) Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol, *J. Clin. Oncol.*, **17**, 3283-3290, doi: 10.1200/JCO.1999.17.10.3283.
101. Jaakkola, K., Lahteenmaki, P., Laakso, J., Harju, E., Tykka, H., and Mahlberg, K. (1992) Treatment with antioxidant and other nutrients in combination with chemotherapy and irradiation in patients with small-cell lung cancer, *Anticancer Res.*, **12**, 599-606.
102. Umegaki, K., Aoki, S., and Esashi, T. (1995) Whole body X-ray irradiation to mice decreases ascorbic acid concentration in bone marrow: comparison between ascorbic acid and vitamin E, *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 493-497, doi: 10.1016/0891-5849(95)00033-t.
103. Lenton, K. J., and Greenstock, C. L. (1999) Ability of human plasma to protect against ionising radiation is inversely correlated with age, *Mech. Ageing Dev.*, **107**, 15-20, doi: 10.1016/s0047-6374(98)00128-6.

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ANTIOXIDANTS IN CARCINOGENESIS AND TUMOR THERAPY

Review

S. M. Vostrikova[1,2], A. B. Grinev[2], and V. G. Gogvadze[1,3]*

[1] *Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: vlad_gogvadze@rambler.ru*

[2] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

[3] *Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden*

Received July 14, 2020
Revised August 7, 2020
Accepted August 7, 2020

Strictly regulated balance between the formation and utilization of reactive oxygen species (ROS) is the basis of normal functioning of organisms. ROS play an important role in the regulation of many metabolic processes; however, excessive content of ROS leads to the development of various disorders, including oncological diseases, as a result of ROS-induced mutations in DNA. In tumors, high levels of oxygen radicals promote cell proliferation and metastasis. On the other hand, high content of ROS can trigger cell death, a phenomenon used in the antitumor therapy. Water- and lipid-soluble antioxidants, as well as antioxidant enzyme systems, can inhibit ROS generation; however, they should be used with caution. Antioxidants can suppress ROS-dependent cell proliferation and metastasis, but at the same time, they may inhibit the death of tumor cells if the antitumor therapeutic agents stimulate oxidative stress. The data on the role of antioxidants in the death of tumor cells and on the effects of antioxidants taken as dietary supplements during antitumor therapy, are contradictory. This review focuses on the mechanisms by which antioxidants can affect tumor and healthy cells.

Keywords: cancer, antioxidants, carcinogenesis, reactive oxygen species, programmed cell death, mitochondria

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1489 – 1499

УДК 616.155.2

ПРОГРАММИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2020 А.А. Мартьянов[1,2,3,4], А.А. Игнатова[2], Г.С. Свидельская[2], Е.А. Пономаренко[2], С.П. Гамбарян[5], А.Н. Свешникова[1,2,3,6], М.А. Пантелеев[1,2,3]*

[1] *Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 109029 Москва, Россия; электронная почта: mapanteleev@yandex.ru*

[2] *НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, 117997 Москва, Россия*

[3] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия*

[4] *ФГБУН Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия*

[5] *ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия*

[6] *ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 16.07.2020
После доработки 24.07.2020
Принята к публикации 24.07.2020

Программируемая клеточная смерть безъядерных клеток крови – тромбоцитов – при онкологических и онкогематологических заболеваниях может играть важную роль в их патофизиологии. Она вносит вклад как в кровотечения (вызванные тромбоцитопенией, связанной с элиминацией тромбоцитов), так и тромбозы (обусловленные процессами свертывания на мембранах экспрессирующих фосфатидилсерин тромбоцитов). В настоящей работе проведена оценка функциональных характеристик и внутриклеточной сигнализации тромбоцитов пациентов с различными онкологическими заболеваниями, находящихся на химиотерапии, в сравнении с тромбоцитами здоровых доноров, а также тромбоцитами, у которых был индуцирован апоптоз АВТ-737. У ряда пациентов выявлена сниженная способность тромбоцитов к агрегации. Иммунофенотипирование этих тромбоцитов показало их предактивацию по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. Анализ кальциевой сигнализации показал, что в тромбоцитах пациентов, как и в апоптотических, происходит повышение внутриклеточного кальция в покое. Однако умеренность этого повышения и экспрессии фосфатидилсерина предполагает ограниченность процессов апоптоза тромбоцитов, остающихся в циркуляции у исследованной группы пациентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, апоптоз, химиотерапия, проточная цитометрия, агрегометрия.

DOI: 10.31857/S0320972520100140

ВВЕДЕНИЕ

Термин «апоптоз» для обозначения программируемой клеточной смерти впервые был предложен J. Kerr в 1972 г. [1], что послужило началом многочисленных исследований определения молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы гибели клеток. Первые упоминания о клеточной смерти безъядерных тромбоцитов начинаются с 1993 г. [2], в то время как каспаз-зависимый апоптоз тромбоцитов был показан в 1997 г. [3]. При этом ранее (в 1994 г.) было убедительно показано, что наличие ядра не является необходимым условием для развития процессов каспаз-зависимого апоптоза в клетке [4]. В тромбоцитах экспрессируются практически все белки, принимающие непосредственное участие в апоптозе [5]. Характерные маркеры и признаки разных видов клеточной смерти сначала обнаружили у тромбоцитов при хранении тромбоконцентратов [6], потом при старении *in vivo* [7], при иммунной тромбоцитопении [8], иных заболеваниях, воздействии определенных препаратов и продуктов, а также при физиологической активации [9]. Сейчас распространенность этих процессов *in vivo* и *in vitro* стала оче-

Принятые сокращения: фосфатидилсерин – PS; Bcl-гомологичный домен 3 – BH3; циклический аденозин монофосфат – cAMP; циклический гуанозин монофосфат – цГМФ; острый лимфобластный лейкоз – ОЛЛ; богатая тромбоцитами плазма – PRP; активируемый протеазами рецептор 1 – PAR1; гликопротеин Ib – GPIb.

* Адресат для корреспонденции.

видной, но список продолжает пополняться. Так, последние работы указывают на важность апоптоза в процессе жизни артериального тромба и регуляции его стабильности [10].

Однако в существующей сейчас картине есть два зияющих пробела. Первый из них связан с плохим пониманием молекулярных механизмов клеточной смерти тромбоцитов в разных ситуациях. Большинство работ до последнего времени предпочитало термин «апоптоз»; как сейчас понятно, это глубоко некорректно [11]. Выявляется [12–14] как минимум два различных механизма клеточной смерти тромбоцитов с принципиально разной динамикой и регуляцией. Апоптоз тромбоцитов является достаточно медленным процессом (часы), независимым от концентрации кальция в окружающей среде, и, похоже, идущим по классическому внутреннему пути апоптоза до момента активации каспазы-3 [3, 15–17]. Программируемая клеточная смерть тромбоцитов при их физиологической активации, скорее всего, относящаяся к типу митохондриально-зависимого некроза [13, 18], происходит за гораздо более короткие времена (минуты), требует физиологической концентрации внеклеточного кальция и ингибируется циклоспорином А, но не ингибиторами каспаз [17, 19, 20].

Вторая проблема связана со значимостью разных вариантов программируемой клеточной смерти тромбоцитов. Наши последние работы выявили способность умерших тромбоцитов встраиваться в тромбы [21], открыли новый механизм их агрегации [22] и способность стимулировать контактный путь свертывания [23], распространенность апоптотических тромбоцитов при гематологических нарушениях и их корреляцию с кровоточивостью [24]. Показано, что специальные механизмы инактивации адгезионной способности этих тромбоцитов могут быть отрицательными регуляторами тромбообразования [25], в то время как специфическая мембранная структура участвует в реакции свертывания [26]. Однако, хотя роль программируемой клеточной смерти тромбоцитов в норме и патологии сейчас кажется все более важной (если не центральной), прямых доказательств и ясности в этом вопросе еще нет.

Тромбоциты, являясь ключевым звеном гемостаза, в то же время принимают активное участие в иммунных реакциях при воспалительных процессах и в развитии онкологических процессов с образованием метастазов. При активации происходит секреция тромбоцитарных α-гранул, содержащих факторы роста и хемокины, а также фибриноген, фактор фон Виллебранда, фибронектин и другие важные для системы свертывания белки [27]. Кроме α-гранул при активации тромбоцитов также происходит секреция δ-гранул (также называемых плотными гранулами), содержащих АДФ, АТФ, серотонин [28]. Тромбоциты образуют агрегаты с раковыми клетками, что пролонгирует рост опухоли, изолируя ее от иммунной атаки, и способствует образованию вторичных очагов опухолевого роста. В свою очередь, раковые клетки и их микрочастицы секретируют прокоагулянтные факторы, которые вызывают активацию тромбоцитов и образование тромбов [29]. Исследование роли тромбоцитов в развитии онкологических процессов и при противоопухолевой терапии в последнее время становится особенно актуальным, поскольку показано нами и другими [12, 15, 16, 30], что многие противораковые препараты могут напрямую действовать на тромбоциты, вызывая их активацию/ингибирование, а также гибель этих клеток, что приводит к тромбоцитопении. Гибель тромбоцитов, сопровождаемая падением митохондриального потенциала, появлением на поверхности клеток фосфатидилсерина (PS), образованием микрочастиц и высвобождением цитохрома *c*, может развиваться по нескольким сценариям, включающим как классический механизм каспаз-зависимого апоптоза, так и механизм каспаз-независимого образования прокоагулянтных тромбоцитов, которые играют существенную роль в коагуляции крови. Одни из наиболее широко применяемых при онкологии крови противоопухолевых препаратов – ингибиторы семейства антиапоптотических белков Bcl-2, которые, наряду с позитивным противоопухолевым эффектом, вызывают глубокую тромбоцитопению, вследствие чего приходится прерывать или прекращать курс химиотерапии. Как в наших работах, так и в работах коллег [12, 15, 31] было показано, что противораковые препараты ABT-263 (navitoclaxs) и ABT-737, являясь BH3-миметиками, индуцируют классический каспаз-зависимый апоптоз тромбоцитов, что приводит к уменьшению циркулирующих в крови клеток.

Еще одним важным фактором, влияющим на гемостаз при онкологических заболеваниях и применении противоопухолевых препаратов, является то, что при этом происходит ингибирование индуцированной агонистами активации тромбоцитов. Из хорошо известных агонистов тромбоцитов изучена только реакция на тромбин и показано, что при каспаз-зависимом апоптозе тромбоциты не активируются тромбином. Однако неизвестно, будут ли эти препараты также ингибировать активацию тромбоцитов, вызванную другими агонистами. Также мало изучен механизм, лежащий в основе ингиби-

рования тромбоцитов при применении противоопухолевых препаратов. Активация системы циклических нуклеотидов (cAMP, cGMP) и соответствующих им протеинкиназ (PKA, PKG), которые фосфорилируют множественные субстраты [32, 33], является одним из основных механизмов, ответственных за ингибирование тромбоцитов. Недавно [15] нам удалось показать, что ингибирование активации тромбоцитов при каспаз-зависимом апоптозе обусловлено активацией PKA. Сама PKA является тетрамером, состоящим из двух регуляторных субъединиц, на которые прикрепляются две молекулы cAMP, и двух каталитических субъединиц. Для активации PKA необходимо присоединение молекул cAMP к регуляторным субъединицам, при этом каталитические субъединицы диссоциируют от регуляторных и PKA активируется. Мы показали, что активация PKA непосредственно коррелирует с активностью каспазы-3. Однако сама каспаза-3 в опытах *in vitro* не приводит к диссоциации каталитической субъединицы. Эти данные указывают на существование более сложного механизма активации PKA при индукции каспаз-зависимого апоптоза в тромбоцитах.

В настоящей работе проведены исследование активности тромбоцитов пациентов, находящихся на противоопухолевой терапии, и сравнение тромбоцитов пациентов с тромбоцитами здоровых доноров, проинкубированными с индуктором апоптоза (ABT-737). Наши результаты и данные предыдущих работ позволили предложить схему воздействия BH3-миметиков на тромбоцит.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследовании были использованы следующие материалы: чувствительный к концентрации кальция, проникающий сквозь липидные мембраны клеток флуорофор Fura-Red-AM («Molecular Probes», Eugene, OR); АДФ, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), SFLLRN, фибриноген человека, аннексин-V-Alexa-647, краситель Alexa-488 («Sigma-Aldrich», США); NaCl, Na_2HPO_4, KCl, $NaHCO_3$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ («АгатМед», Россия), CD62p-Alexa-647, PAC-1-FITC («Sony Biotechnology», США).

Критерии включения пациентов в исследование. В исследование на проточной цитометрии было включено 14 пациентов с диагнозом ОЛЛ (4 девочки и 10 мальчиков, 2–16 лет, медиана 7,5 лет), получавших лечение по протоколу Москва–Берлин ALL-MB 2008. Кровь для анализа функционального состояния тромбоцитов забирали на разных этапах терапии в 8 точках. Точки 1, 5 и 8 – перед началом курсов консолидации 1, 2 и 3 соответственно; точки 4 и 7 в конце курсов консолидации 1 и 2, точки 3, 4 – в середине курса консолидации 1 до и после введения L-аспарагиназы, точка 6 – в середине курса консолидации 2. В данном исследовании у одного из пациентов случился неокклюзивный тромбоз брахиоцефальной вены справа в месте стояния центрального венозного катетера между точками 4 и 5. Также было два пациента с тромботическими наложениями на конце центрального венозного катетера: у одного пациента в точке 2, у другого между точками 6 и 7.

Помимо пациентов с ОЛЛ, в исследование также были включены пациенты со следующими заболеваниями: ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (пациент 1), острый миелоидный лейкоз (пациент 2), агранулоцитоз (пациент 3), острый промиелоцитарный лейкоз (пациент 4), злокачественное новообразование почки (пациенты 5 и 7), злокачественное новообразование забрюшинного пространства (пациент 6). Данным пациентам, по причине разнообразия их диагнозов, было проведено расширенное исследование тромбоцитов на проточном цитометре (анализ внутриклеточной сигнализации), а также исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния.

Анализ малоуглового светорассеяния тромбоцитами при агрегации. Методика исследования агрегации тромбоцитов посредством малоуглового светорассеяния на лазерном анализаторе LaSca TM («БиоМедСистем», Россия) была описана ранее в работе [34]. Метод основан на измерении малоуглового светорассеяния суспензии тромбоцитов. Этот метод был использован для характеризации функции тромбоцитов, позволяя одновременно исследовать изменение формы тромбоцитов и формирование диагрегатов тромбоцитов (светорассеяние под углом 1,5°), а также обычную агрегацию тромбоцитов (светорассеяние под углом 12°) при стимуляции малыми дозами АДФ. Для исследования посредством центрифугирования крови (забранной в вакуумные пробирки с 3,8%-ным цитрата натрия) при 100 g была получена богатая тромбоцитами плазма (PRP). Полученная PRP была разведена буфером Тирода (150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,4 мМ Na_2HPO_4, 20 мМ HEPES, 5 мМ глюкозы, 0,5%-ного бычьего сывороточного альбумина, pH 7,3) до концентрации 10 000 тромбоцитов/мкл. Полученная суспензия клеток была стимулирована 500 нМ АДФ, начальная скорость агрегации и максимальная амплитуда агрегации были измерены.

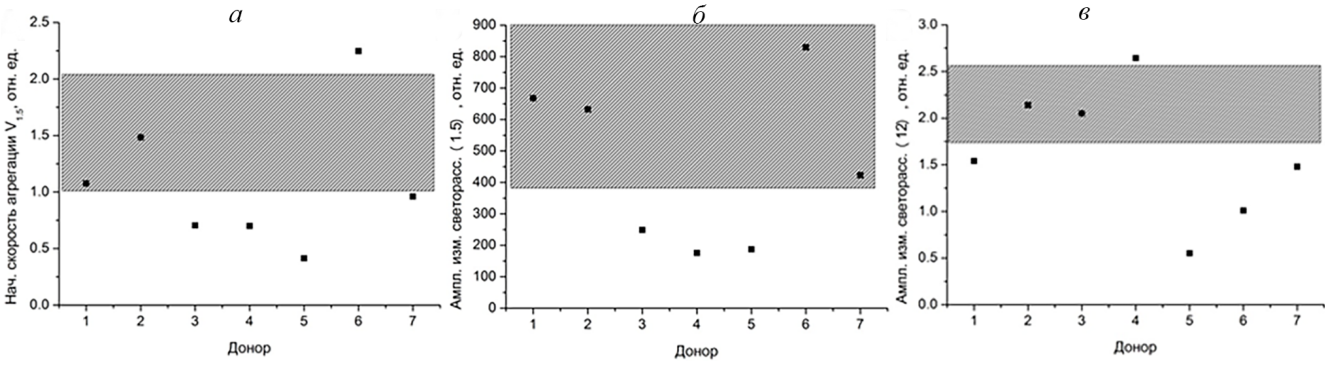


Рис. 1. Исследование проагрегантного ответа тромбоцитов пациентов методом малоуглового светорассеяния. *а* – Начальная скорость формирования диагрегатов была снижена (или на нижней границе нормы) для всех пациентов, кроме пациентов 2 и 6, у которых, наоборот, наблюдалось повышение начальной скорости формирования диагрегатов тромбоцитов; *б* – максимальная амплитуда светорассеяния, соответствующего диагрегатам была снижена у пациентов 3, 4, 5, а также находилась на нижней границе нормы для пациента 7; *в* – максимальная степень агрегации тромбоцитов пациентов была снижена у всех пациентов, кроме пациентов 2, 3, 4. Серым фоном обозначены границы нормы для здоровых доноров

Цитофлуориметрическое исследование функциональной активности тромбоцитов. Кровь пациентов забирали в пробирки с 3,8%-ным цитратом натрия, получали богатую тромбоцитами плазму центрифугированием 100 g в течение 8 мин и доводили концентрацию тромбоцитов до 50 тыс/мкл разбавлением модифицированным буфером Тирода. Затем тромбоциты инкубировали с мепакрином для окраски плотных гранул, стимулировали пептидом SFLLRN (активатор тромбинового рецептора PAR1) и инкубировали с антителами против ключевых тромбоцитарных антигенов: PAC1-FITC, CD62P-Alexa-647, Annexin-V-Alexa-647. В качестве контроля использовали кровь 14 здоровых добровольцев. Подробное описание методики приведено в работе [35]. Сравнение между группами пациентов и здоровых добровольцев проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Цитофлуориметрическое исследование внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах. Исследование проводили посредством проточного цитометра BD FACS Canto II. К пробам добавляли конъюгированный с Alexa-488 фибриноген человека в концентрации 100 мкг/мл. После этого пробы анализировали в кинетическом режиме. Через 60 с после начала исследования к пробам добавляли активатор (2 мкМ АДФ). Для пересчёта флуоресценции Fura-Red в концентрации кальция последовательно добавляли 1 мкМ иономицина и 10 мМ EGTA. Пересчет проводили по формуле Гринкевича [36]. Дополнительно производили нормировку на теоретически рассчитанную концентрацию кальция в присутствии 10 мМ EGTA на основе [36, 37]. Связывание фибриногена считалось максимальным после инкубации пробы с 1 мкМ иономицина в течение 3 мин. Подробное описание методики приведено в работах [38, 39].

Статистическая обработка данных. Результаты анализа малоуглового светорассеяния, а также проточной цитофлуориметрии были обработаны посредством программного обеспечения Origin Pro (https://www.originlab.com/origin) и FlowJo (https://www.flowjo.com/) соответственно. Статистический анализ данных был проведен посредством Python 3.6, статистическую значимость оценивали по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Агрегационная способность апоптотических тромбоцитов снижена. Ключевым функциональным ответом тромбоцитов крови человека является их способность к агрегации при активации. Золотым стандартом для лабораторного анализа агрегационной способности тромбоцитов является агрегометрия светопропускания [40, 41]. Одним из подходов к усовершенствованию данного метода является метод малоуглового светорассеяния, позволяющий более точно исследовать не только агрегационную кривую тромбоцитов (образование диагрегатов наблюдается по светорассеянию под углом 1,5°), но и изменение ими формы (светорассеяние под углом 12°) в ответ на слабую активацию [34].

Данным методом была оценена агрегация тромбоцитов у семи пациентов (см. Дополнительные материалы), находящихся на химиотерапии. Получено, что у половины пациентов наблюдалось ослабление агрегации тромбоцитов или агрегация тромбоцитов находится на нижней границе нормы (рис. 1, *а*, *б*, пациенты 3,

4, 5, 7). С другой стороны, изменение формы у тромбоцитов доноров 2 и 3 не было нарушено, а у пациента 4 было даже повышено (рис. 1, *в*), в то время как наблюдалось сниженное изменение формы тромбоцитов у пациентов 1, 5, 6, 7.

Функциональные характеристики тромбоцитов пациентов на химиотерапии. Для оценки причин полученных выше различий между пациентами, находящимися на химиотерапии, а также здоровыми донорами было проведено исследование функциональных характеристик активации тромбоцитов в покое и при активации SFLLRN (20 мкМ). Функциональные характеристики тромбоцитов оценивались в различные моменты терапии, схема терапии приведена в дополнительных материалах.

При секреции тромбоцитарных α-гранул также происходит выставление на внешнюю мембрану тромбоцитов Р-селектина (CD62p) – мембранного белка, важного для взаимодействия тромбоцитов с иммунными клетками (через PSGL рецепторы). В точках 1–5 наблюдали достоверное повышение Р-селектина в покоящихся тромбоцитах, однако при активации не было значимых отличий по выставлению Р-селектина по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2, *а*, *б*).

В плотных гранулах тромбоцитов наблюдается снижение pH по сравнению с другими внутриклеточными органеллами, что позволяет использовать для их исследования мепакрин. В покоящихся тромбоцитах пациентов наблюдалось снижение флуоресценции мепакрина по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров (рис. 2, *в*). При активации тромбоцитов различий не наблюдалось (рис. 2, *г*). Таким образом, можно сделать вывод, что тромбоциты пациентов в покоящемся состоянии дегранулированы по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. Анализ активации тромбоцитарных интегринов (посредством антитела PAC-1) – первичного проагрегантного ответа тромбоцитов – показал отсутствие различий между тромбоцитами пациентов в покоящемся состоянии и при активации (рис. 1, *д*, *е*), за исключением первой точки при активации (рис. 1, *е*).

Сравнение внутриклеточной сигнализации тромбоцитов пациентов на химиотерапии и апоптотических тромбоцитов. Для исследования причин наблюдаемой первичной дегрануляции тромбоцитов (рис. 1, *а*, *в*) было проведено исследование кальциевой сигнализации тромбоцитов пациентов, а также тромбоцитов здоровых доноров, прединкубированных с ABT-737. Кальций является ключевым вторичным мессенджером активации тромбоцита, запускающим как дегрануляцию, так и проагрегантный ответ тромбоцита. Ранее было убедительно продемонстрировано, что перегрузка митохондрий кальцием также запускает и некроз тромбоцитов [18, 42], характеризующийся выставлением на внешнюю поверхность тромбоцитарной мембраны отрицательно заряженного фосфолипида фосфатидилсерина.

Методом проточной цитометрии в кинетическом режиме получено, что в покоящихся тромбоцитах пациентов наблюдается повышение концентрации свободных ионов кальция (17 нМ) по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров (9 нМ, рис. 3, *а*). При инкубации с ABT-737 в течение 1 ч в тромбоцитах наблюдалось более значительное увеличение концентрации кальция (39 нМ, рис. 3, *а*). При активации тромбоцитов 2 мкМ АДФ, как и при более сильной стимуляции 20 мкМ SFLLRN (рис. 2), наблюдался одинаковый максимальный уровень концентрации кальция. Данные результаты также могут свидетельствовать об предактивации тромбоцитов у пациентов, находящихся на химиотерапии, а также о том, что это может быть следствием запуска апоптоза в тромбоцитах этих пациентов.

Исследование связывания фибриногена показало, что апоптотические (инкубированные с ABT-737) тромбоциты значительно слабее связывают фибриноген, нежели тромбоциты здоровых доноров или тромбоциты пациентов (рис. 3, *в*). Наконец, в популяции инкубированных с ABT-737 тромбоцитов наблюдалась наибольшая доля положительных по аннексину-V тромбоцитов (рис. 3, *г*). Таким образом, можно заключить, что на более поздних этапах запуска апоптоза можно наблюдать ингибирование активации тромбоцитов, которое происходит из их изначальной предактивации, вероятно, наблюдаемой у пациентов на химиотерапии (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение количества и функциональности тромбоцитов при онкогематологических заболеваниях является давно установленным феноменом, однако причины этих изменений могут быть различны. Одной из причин тромбоцитопатий является индукция химиотерапией апоптоза тромбоцитов [43]. В настоящей работе проведено исследование функциональной активности тромбоцитов пациентов с онкогематологическими заболеваниями, находящихся на химиотерапии. Показано, что тромбоциты пациентов обладают признаками предактивации, а именно повышенной экспрессией Р-селектина,

сниженным количеством плотных гранул и повышенной концентрацией цитозольного кальция. При этом при активации тромбоцитов наблюдается сниженная способность к агрегации и активации интегринов. На основании настоящего исследования и наших предыдущих работ мы предлагаем схему апоптоза тромбоцитов, при котором предактивация тромбоцитов является следствием повышенной концентрации цитозольного кальция, а ингибирование интегринов связано с активацией каспазы-3 и зависимой от нее активацией протеинкиназы А (см. рис. 4).

Известно, что химиотерапия способна вызывать тромбоцитопению благодаря индукции каспаз-зависимой гибели тромбоцитов и мегакариоцитов [20, 43]. Однако открытым остается вопрос о функциональной активности остав-

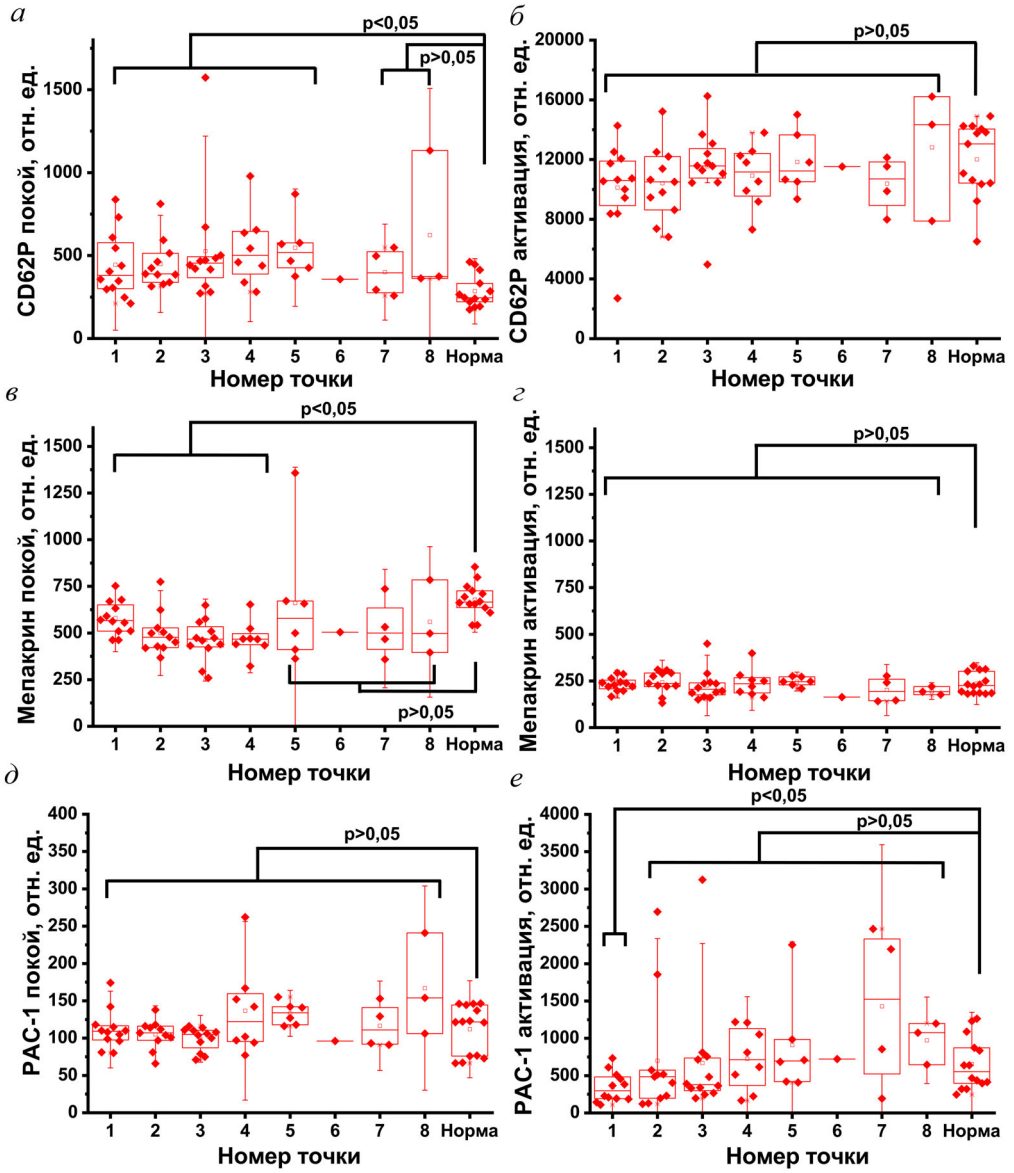


Рис. 2. Функциональные характеристики тромбоцитов пациентов в различные дни исследования. *а*, *б* – На тромбоцитах пациентов повышено выставление Р-селектина (выход α-гранул) по сравнению со здоровыми донорами в начальных точках исследования в покое (*а*), однако при активации количества Р-селектина на тромбоцитах пациентов лежат в пределах нормы (*б*); *в*, *г* – в покоящихся тромбоцитах пациентов в начальных точках эксперимента наблюдалась сниженная флуоресценция мепакрина, что свидетельствует о выходе из них δ-гранул (*в*), в то время как при активации флуоресценция мепакрина в тромбоцитах доноров лежала в пределах нормы (*г*); *д*, *е* – активация тромбоцитарных интегринов GPIIb-IIIA (связывание PAC-1) у пациентов не была нарушена в покое (*д*), в то время как при активации только в начальной точке исследования наблюдалось снижение активации интегринов (*е*). Статистическая значимость была оценена по критерию Манна–Уитни. (С цветными вариантами рис. 2–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

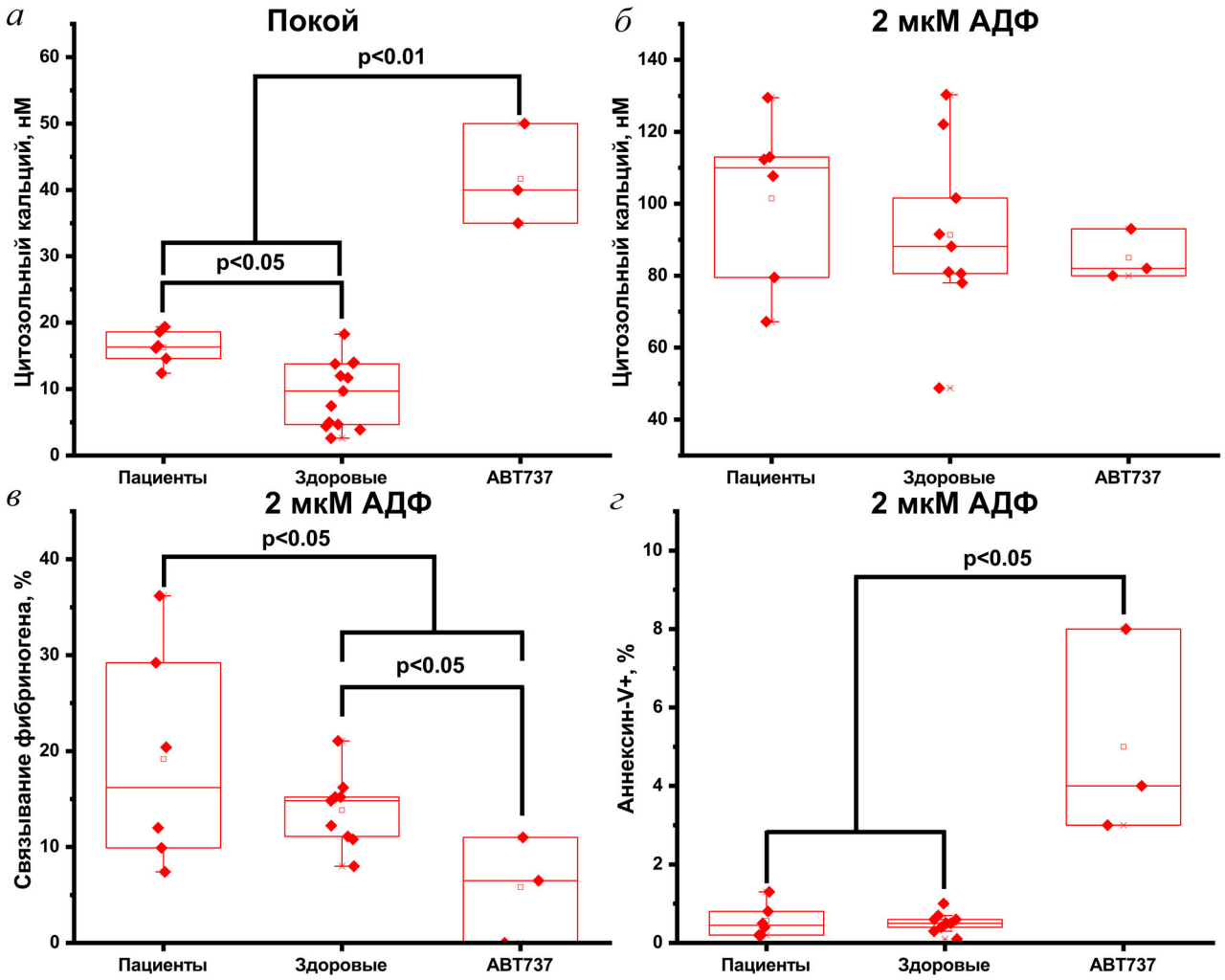


Рис. 3. Сравнение внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах пациентов, здоровых доноров и апоптотических тромбоцитах (АВТ-737). *а* – В покоящихся тромбоцитах пациентов повышен кальций, однако в тромбоцитах, прединкубированных с АВТ-737, повышение кальция более значительно; *б* – при активации 2 мкМ АДФ не наблюдается значительных различий между тромбоцитами пациентов, здоровых доноров, а также апоптотическими тромбоцитами по кальциевому ответу; *в* – связывание фибриногена апоптотическими тромбоцитами было снижено по сравнению с тромбоцитами пациентов и здоровых доноров; *г* – выставление фосфатидилсерина (связывание Аннексина-V) апоптотическими тромбоцитами было значительно усилено по сравнению с тромбоцитами пациентов и здоровых доноров. Статистическая значимость была оценена по критерию Манна–Уитни

шихся «в живых» тромбоцитов. Для мышей ранее была показана сниженная способность к активации и агрегации тромбоцитов при воздействии BH3-миметиков [44]. В настоящем исследовании мы показываем, что способность тромбоцитов пациентов на химиотерапии образовывать агрегаты и активировать интегрины заметно снижена по сравнению со здоровыми донорами. Этот результат находится в соответствии с нашими ранее полученными данными о том, что тромбоциты, инкубированные с АВТ-737, не образуют агрегаты и не связывают PAC-1 (антитело к активированным тромбоцитарным интегринам) [15]. Эти же результаты (ингибирование способности тромбоцитов к активации при воздействии BH3-миметиков) подтверждаются работами других авторов [44, 45]. Следует подчеркнуть, что в настоящем исследовании мы впервые показываем гипоагрегационную способность не всей популяции тромбоцитов, а только той субпопуляции, которая не испытала клеточную смерть (тромбоциты не экспонируют фосфатидилсерин). Гипоагрегация тромбоцитов находящихся на онкотерапии пациентов не была показана ранее, так как классический метод агрегометрии требует концентрации тромбоцитов выше 150 тыс/мкл, в то время как используемый в настоящей работе метод LaSca позволяет наблюдать агрегационную способность тромбоцитов, начиная с концентрации 10 тыс/мкл [34, 46].

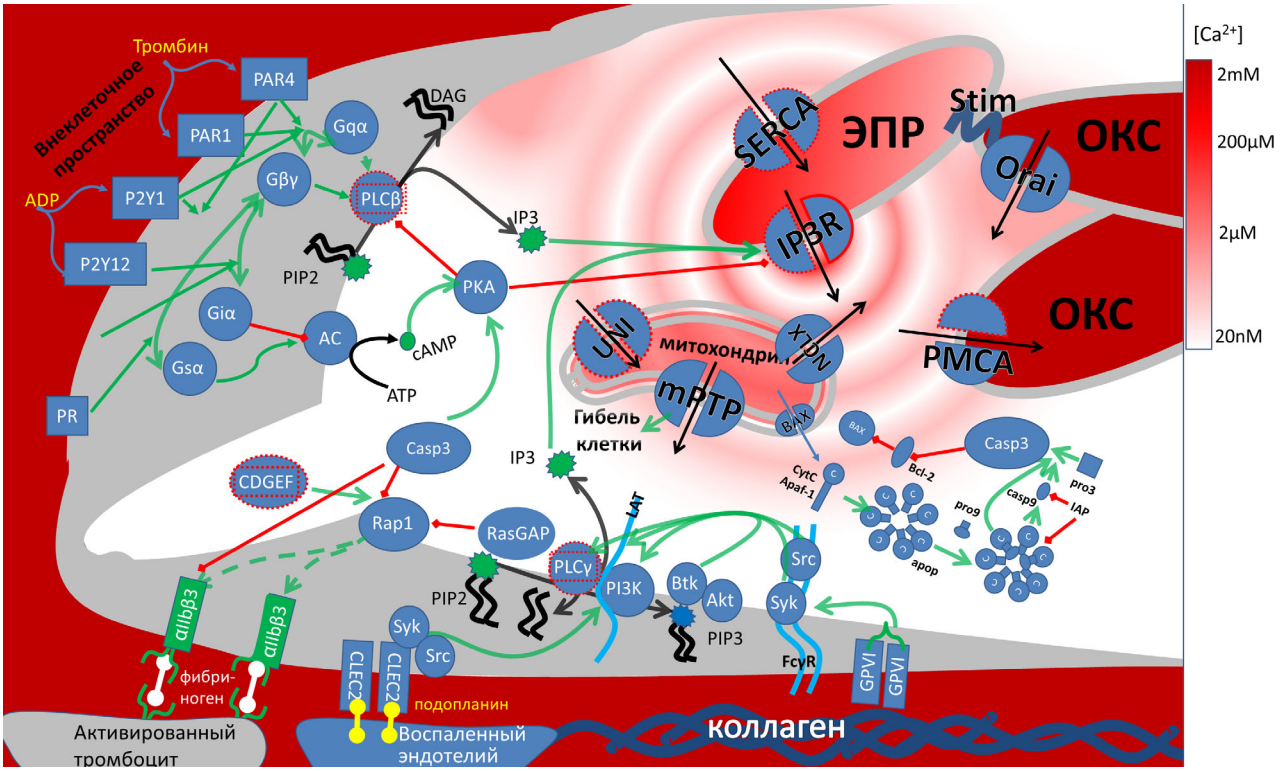


Рис. 4. Схема сигнализации, запускающей апоптоз или некроз в тромбоцитах крови. Оттенками красного (серого в ч/б версии) цвета обозначена концентрация ионов кальция. Стрелками показана активация, ромбами – ингибирование, черными линиями показаны потоки вещества. Синими (сплошными) овалами обозначены ферменты с приведенными общепринятыми сокращениями их названий. Точечный контур означает зависимость активности фермента от концентрации кальция. Синими прямоугольниками обозначены рецепторы плазматической мембраны. Серые прямоугольники и овалы – белки апоптотического аппарата. apop – Комплекс белков апоптосомы, включающий Apaf-1 и цитохром *c*, а в последствии прокаспазы 3 и 9. ЭПР – эндоплазматический ретикулум, ОКС – открытая канальцевая система (внеклеточное пространство)

Механизмы сниженной активации интегринов тромбоцитов при воздействии BH3-миметиков были показаны в работе [15], а именно, ABT-737 через активацию каспазы-3 стимулирует активацию протеинкиназы А без повышения уровня цАМФ, протеинкиназа А, в свою очередь, ингибирует активацию тромбоцита. Кроме того, нами было показано, что ABT-737 ингибирует активацию тромбоцитов путем каспаза 3 – зависимого ингибирования цитозольной фосфолипазы А2, отвечающей за синтез тромбоксана А2 и вторичную активацию тромбоцитов [5]. Эти результаты также подтверждаются тем, что активация тромбоцитов через $P2Y_{12}$ (рецептор, ассоциированный с Gi-белком) снижает эффекты BH3-миметиков на активацию тромбоцита [6]. Возможно, что механизм ингибирования активации интегринов у пациентов на химиотерапии аналогичен, но для проверки этого необходимо оценить уровень форфорилирования мишеней протеинкиназы А у данных пациентов.

В настоящей работе показано наличие предактивации тромбоцитов пациентов по следующим параметрам. Во-первых, у пациентов на BH3-миметиках происходит частичная секреция как α-, так и плотных гранул. Несмотря на то, что везикуляция мембраны тромбоцитов при воздействии BH3-миметиков была многократно показана [17, 47], мы предполагаем, что наблюдаемая в данном исследовании предактивация тромбоцитов имеет другую природу. При этом количество рецепторов-гликопротеинов соответствует норме. Следует заметить, что здесь наши результаты противоречат работам [44], которые показывают шеддинг рецептора GPIb в ответ на воздействие BH3-миметиков. Противоречие в результатах может быть связано как с особенностями пациентов, так и с используемыми временами воздействия препаратов: в работе [44] проводили временную (90 мин) инкубацию тромбоцитов здоровых доноров с препаратами либо проводили наблюдения на мышах, в работе [45] также наблюдали за пациентами с лимфопролиферативными расстройствами, однако шеддинг рецепторов наблюдался как до, так и после терапии.

Далее мы показываем повышенную концентрацию цитозольного кальция тромбоцитов пациентов в покоящемся состоянии или тромбоцитов, испытавших воздействие АВТ-737. Последний результат находится в согласии с работами предыдущих авторов, которые наблюдали повышение концентрации цитозольного кальция при воздействии АВТ-263 [16, 45], в то время как в работе других авторов [44] АВТ-737 не вызывал повышения концентрации кальция. Эти результаты не противоречат друг другу, потому, как аргументируется в работе [45], повышение концентрации кальция наблюдалось только в первые минуты воздействия препарата. Кроме того, в настоящей работе используется метод нормирования концентрации кальция по буферному раствору, содержащему 40 нМ кальция, что позволяет различать низкие концентрации [39]. Благодаря этому можно увидеть небольшие, но достоверные различия концентрации кальция в тромбоцитах пациентов и здоровых доноров.

Механизмы предактивации тромбоцитов у пациентов, находящихся на химиотерапии, будут являться предметом дальнейших исследований. Возможно, как предполагается в работе [45] и по аналогии с иммунной тромбоцитопенией [39], происходит изменение проницаемости плазматической мембраны (вероятно, каспаз-зависимое [17]) или мембраны эндоплазматического ретикулума [47] для ионов кальция. Это может быть связано с деполяризацией мембраны митохондрий [5, 8], в результате чего митохондрии не могут выступать как дополнительные резервуары для ионов кальция. С другой стороны, в наших исследованиях и в работе [14] деполяризация мембраны наблюдается только у тромбоцитов, «вступивших» на путь клеточной смерти. Требуется дополнительное исследование тромбоцитов пациентов на предмет содержания кальция в ЭПР и потенциала митохондрий для прояснения этого вопроса. Следует отметить, что, как предполагается в работе [17], тромбоциты пациентов могут находиться «на пути в некроз». Однако при наблюдении методом проточной цитометрии, выполненной в настоящем исследовании, субпопуляций тромбоцитов пациентов ни по одному показателю не наблюдалось, что может служить аргументом против скорого потенциального некроза тромбоцитов пациентов.

Финансирование. Работа была поддержана грантом Фонда «Наука – детям», а также грантом РФФИ 17-00-00141-комфи (17-00-00138/17-00-00139/17-00-00140).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Надежде Александровне Подоплеловой (ЦТП ФХФ РАН) за ценные дискуссии при выполнении данной работы. Авторы благодарны Марии Григорьевне Степанян (ЦТП ФХФ РАН) и Ольге Ильиничне Ан (МГМА им. Сеченова) за помощь при выполнении экспериментов по проточной цитометрии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование было одобрено независимым этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (решение N 1 от 12.01.2018).

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 10, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, **26**, 4, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
2. Dachary-Prigent, J., Freyssinet, J. M., Pasquet, J. M., Carron, J. C., and Nurden, A. T. (1993) Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups, *Blood*, **81**, 2554-2565.
3. Vanags, D. M., Orrenius, S., and Aguilar-Santelises, M. (1997) Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis, *Brit. J. Haemat.*, **99**, 824-831, doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.4813284.x.
4. Jacobson, M. D., Burne, F., and Raff, M. C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus, *EMBO J.*, **13**, 1899-1910.
5. Burkhart, J. M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R. P. (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways, *Blood*, **120**, 73-82.
6. Leytin, V., and Freedman, J. (2003) Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models, *Transfus. Apher. Sci.*, **28**, 285-295, doi: 10.1016/S1473-0502(03)00048-X.
7. Mason K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., et al. (2007) Programmed anuclear cell death delimits platelet life span, *Cell*, **128**, 1173-1186, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.037.
8. Li, J., van der Wal, D. E., Guangheng, Z., Xu, M., Yougbare, I., et al. (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia, *Nat. Commun.*, **6**, 1-16, doi: 10.1038/ncomms8737.
9. Leytin, V. D., Allen, J., Mykhaylov, S., Lyubimov, E., and Freedman, J. (2006) Thrombin-triggered platelet apopto-

sis, *J. Thromb. Haem.*, **4**, 2656-2663, doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02200.x.
10. Maagdenberg, C. G., de Boer, O. J., Li, X., Mackaay, C., Niessen, H. W., Winter, R. J., and van der Wal, A. C. (2016) Time dependent apoptotic rates in the evolving coronary thrombus mass of myocardial infarction patients, *Thromb. Res.*, **145**, 12-17, doi: 10.1016/j.thromres.2016.07.003.
11. Hua, V. M., and Chen, V. M. Y. (2015) Procoagulant platelets and the pathways leading to cell death, *Semin. Thromb. Hemost.*, **41**, 405-412, doi: 10.1055/s-0034-1544002.
12. Rukoyatkina, N., Mindukshev, I., Walter, U., and Gambaryan, S. (2013) Dual role of the p38 MAPK/cPLA2 pathway in the regulation of platelet apoptosis induced by ABT-737 and strong platelet agonists, *Cell Death Dis.*, **4**, 931, doi: 10.1038/cddis.2013.459.
13. Sveshnikova, A. N., Ataullakhanov, F. I., and Panteleev, M. A. (2015) Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1, *Mol. Biosyst.*, **11**, 1052-1060, doi: 10.1039/c4mb00667d.
14. Obydennyy, S. I., Sveshnikova, A. N., Ataullakhanov, F. I., and Panteleev, M. A. (2016) Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation, *J. Thromb. Haemost.*, **14**, 1867-1881, doi: 10.1111/jth.13395.
15. Rukoyatkina, N., Butt, E., Subramanian, H., Nikolaev, V. O., Mindukshev, I., Walter, U., Gambaryan, S., and Benz, P. M. (2017) Protein kinase A activation by the anti-cancer drugs ABT-737 and thymoquinone is caspase-3-dependent and correlates with platelet inhibition and apoptosis, *Cell Death Dis.*, **8**, 2898, doi: 10.1038/cddis.2017.290.
16. Vogler, M., Hamali, H. A., Sun, X., Bampton, E. T. W., Dinsdale, D., et al. (2011) BCL2/BCL-XL inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation, *Blood*, **117**, 7145-7154, doi: 10.1182/blood-2011-03-344812.
17. Wei, H., and Harper, M. T. (2019) ABT-737 triggers caspase-dependent inhibition of platelet procoagulant extracellular vesicle release during apoptosis and secondary necrosis *in vitro*, *Thromb. Haemost.*, **119**, 1665-1674, doi: 10.1055/s-0039-1693694.
18. Arachiche, A., Kerbiriou-Nabias, D., Garcin, I., Letellier, T., and Dachary-Prigent, J. (2009) Rapid procoagulant phosphatidylserine exposure relies on high cytosolic calcium rather than on mitochondrial depolarization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 1883-1889, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190926.
19. Dasgupta, S. K., Argaiz, E. R., Chedid Mercado, J. E., Elizondo Maul, H. O., Garza, J., et al. (2010) Platelet senescence and phosphatidylserine exposure: phosphatidylserine in stored platelets, *Transfusion*, **50**, 2167-2175, doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02676. x.
20. Yakimenko, A. O., Verholomova, F. Y., Kotova, Y. N., Ataullakhanov, F. I., and Panteleev, M. A. (2012) Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations', *Biophys. J.*, **102**, 2261-2269, doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.004.
21. Abaeva, A. A., Canault, M., Kotova, Y. N., Obydennyy, S. I., Yakimenko, A. O., et al. (2013) Procoagulant platelets form an α-granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29621-29632, doi: 10.1074/jbc.M113.474163.
22. Zakharova, N. V., Artemenko, E. O., Podoplelova, N. A., Sveshnikova, A. N., Demina, I. A., Ataullakhanov, F. I., and Panteleev, M. A. (2015) Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII, *PLoS One*, **10**, 0116665, doi: 10.1371/journal.pone.0116665.
23. Suntsova, E. V., Demina, I. M., Ignatova, A. A., Ershov, N. M., Trubina, N. M., et al. (2017) Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura, *Int. J. Hematol.*, **105**, 841-848, doi: 10.1007/s12185-017-2207-3.
24. Artemenko, E. O., Yakimenko, A. O., Pichugin, A. V., Ataullakhanov, F. I., and Panteleev, M. A. (2016) Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets, *Biochem. J.,* **473**, 435-448, doi: 10.1042/BJ20150779.
25. Podoplelova, N. A., Sveshnikova, A. N., Kotova, Y. N., Eckly, Y. N., Receveur, N., et al. (2016) Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting, *Blood*, **128**, 1745-1755, doi: 10.1182/blood-2016-02-696898.
26. Versteeg, H. H., Heemskerk, W. M., Levi, M., and Reitsman, P. H. (2013) New fundamentals in hemostasis, *Physiol. Rev.*, **93**, 327-358, doi: 10.1152/physrev.00016.2011.
27. De Meyer, S. F. (2017) Platelet granules in vascular integrity, *Blood*, **129**, 1573-1574, doi: 10.1182/blood-2017-02-763540.
28. Meikle, C. K. S., Kelly, C. A., Garg, P., Wuescher, L. M., Ali, R. A., and Worth, R. G. (2016) Cancer and thrombosis: the platelet perspective, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **4**, 147, doi: 10.3389/fcell.2016.00147.
29. Thushara, R. M., Hemshekhar, M., Kemparaju, K., Rangappa, K. S., Devaraja, S., and Girish, K. S. (2014) Therapeutic drug-induced platelet apoptosis: an overlooked issue in pharmacotoxicology, *Arch. Toxicol.*, **88**, 185-198, doi: 10.1007/s00204-013-1185-3.
30. Walter, U., and Gabaryan, S. (2009) cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **191**, 533-548, doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_23.
31. Gambaryan, S., and Tsikas, D. (2015) A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? *Amino Acids*, **47**, 1779-1793, doi: 10.1007/s00726-015-1986-1.
32. Mindukshev, I., Gambaryan, S., Kehrer, L., Schuetz, C., Kobsar, A., et al. (2012) Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors, *Clinical Chem. Labor. Med.*, **50**, 125, doi: 10.1515/CCLM.2011.817.
33. Ignatova, A. A., Ponomarenko, E. A., Polokhov, D. M., Suntsova, E. V., Zharkov, P. A., et al. (2019) Flow cytometry for pediatric platelets, *Platelets*, **30**, 428-437, doi: 10.1080/09537104.2018.1513473.
34. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
35. Bers, D. M., Patton, C. W., and Nuccitelli, R. (2010) A practical guide to the preparation of Ca(2+) buffers, *Methods Cell Biol.*, **99**, 1-26, 2010, doi: 10.1016/B978-0-12-374841-6.00001-3.
36. Мартьянов А. А., Морозова Д. С., Хорева А. Л., Пантелеев М. А., Щербина А. Ю., Свешникова Ю. Н. (2020) Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта-Олдрича, *Вопросы онкологии/гематологии и иммунопатологии в педиатрии*, **19**, 100-107.
37. Martyanov, A. A., Morozova, D. S., Sorokina, M. A., Filkova, A. A., Fedorova, D. V., et al. (2020) Heterogeneity of integrin αIIbβ3 function in pediatric immune thrombocytopenia revealed by continuous flow cytometry analysis, *IJMS*, **21**, 3035, doi: 10.3390/ijms21093035.

38. Filkova, A. A., Martyanov, A. A., Garzon Dasgupta, A. K., Panteleev, M. A., and Sveshnikova, A. N. (2019) Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments, *Sci. Rep.*, **9**, 6217, doi: 10.1038/s41598-019-42701-0.
39. Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A., and Toth, K. (2017) Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, doi: 10.3390/ijms18081803.
40. Kile, B. T. (2014) The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets, *Br. J. Haematol.*, **165**, 217-226, doi: 10.1111/bjh.12757.
41. Schoenwaelder, S. M., Jarman, K. E., Gardiner, E. E., Hua, M., Qiao, J., et al. (2011) Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopathy that undermines the hemostatic function of platelets, *Blood*, **118**, 1663-1674, doi: 10.1182/blood-2011-04-347849.
42. Vogler, M., Goodall, A. H., and Cohen, G. M. (2012) Response: BH3 mimetics modulate calcium homeostasis in platelets, *Blood*, **119**, 1321-1322, doi: 10.1182/blood-2011-12-393397.
43. Gupta, R. C. (2016) *Nutraceuticals: Efficacy, Safety, and Toxicity*, Elsevier, Academic Press, Amsterdam.
44. Gyulkhandanyan, A. V., Mutlu, A., Allen, D. J., Freedman, J., and Leytin, V. (2014) BH3-mimetic ABT-737 induces strong mitochondrial membrane depolarization in platelets but only weakly stimulates apoptotic morphological changes, platelet shrinkage and microparticle formation, *Thromb. Res.*, **133**, 73-79, doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.041.
45. Qiao, J., Schoenwaelder, S. M., Mason, K. D., Tran, H., Davis, A. K., et al. (2013) Low adhesion receptor levels on circulating platelets in patients with lymphoproliferative diseases before receiving Navitoclax (ABT-263), *Blood*, **121**, 1479-1481, doi: 10.1182/blood-2012-12-467415.
46. Akl, H., Vandecaetsbeek, I., Monaco, G., Kauskot, A., Luyten, T., et al. (2013) HA14-1, but not the BH3 mimetic ABT-737, causes Ca^{2+} dysregulation in platelets and human cell lines, *Haematologica*, **98**, 49-51, doi: 10.3324/haematol.2012.080598.
47. Harper, M. T., and Poole, A. W. (2012) Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores, *Blood*, **119**, 4337-4338, doi: 10.1182/blood-2012-02-413070.

PROGRAMMED CELL DEATH AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS IN CASE OF ONCOHEMATOLOGIC DISEASES

A. A. Martyanov[1,2,3,4], A.A. Ignatova[2], G.S. Svidelskaya[2], E.A. Ponomarenko[2], S.P. Gambaryan[5], A.N. Sveshnikova[1,2,3,6], and M.A. Panteleev[1,2,3]*

[1] *Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 109029 Moscow, Russia; E-mail: mapanteleev@yandex.ru*

[2] *National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, 117997 Moscow, Russia*

[3] *Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

[4] *Institute for Biochemical Physics (IBCP), Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119334 Moscow, Russia*

[5] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia*

[6] *Department of Normal Physiology, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

Received July 16, 2020
Revised July 24, 2020
Accepted July 24, 2020

Programmed cell death of non-nucleated blood cells – platelets – in case of oncologic and oncohematologic diseases, can be involved in their pathophysiology. It contributes to both bleedings (caused by the thrombocytopenia, which is induced by the elimination of the platelets) and thrombosis (caused by the processes of blood coagulation on the surface of phosphatidylserine exposing platelets). Here we have characterized the functional responses of platelets of patients with various oncological disorders, which were receiving chemotherapy and compared them to the platelets of healthy donors and platelets, pre-incubated with apoptosis inducer ABT-737. Some patients exhibited diminished capability of platelets to aggregate. Immunophenotyping of these platelets revealed their pre-activation in comparison to the platelets of healthy donors. Calcium signaling analysis revealed that in patients' platelets, as well as in apoptotic platelets, intracellular calcium levels were increased in resting cells. However, the modesty of this increase alongside weak phosphatidylserine expression allows us to assume that apoptotic processes in the circulating patients' platelets are limited.

Keywords: platelets, apoptosis, chemotherapy, flow cytometry, aggregometry

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 10, с. 1500 – 1512

УДК 577.24

УЧАСТИЕ ТИРОЗИНКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА ERBB2/HER2 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ

Обзор

© 2020 А.А. Дакс[1#], О.А. Федорова[1#], О.Ю. Шувалов[1], С.Е. Парфеньев[1], Н.А. Барлев[1,2*]

[1] *Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия*

[2] *Московский физико-технический институт (МФТИ), 141701 Московская область, Долгопрудный, Россия; электронная почта: nick.a.barlev@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.07.2020
После доработки 10.08.2020
Принята к публикации 12.08.2020

HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2), известный также как ERBB2, CD340 или протоонкоген Neu, является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Члены семейства ERBB, включая HER2, активируют молекулярные каскады, стимулирующие пролиферацию, миграцию и устойчивость онкогенных клеток к противораковой терапии. Данные белки часто сверхэкспрессированы и/или мутированы в различных типах рака и являются перспективными мишенями для создания противораковой терапии. Для лечения ряда опухолей одобрены анти-HER2 препараты, которые включают в себя моноклональные антитела, а также низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназных рецепторов, таких как лапатиниб, нератиниб и пиротиниб. Помимо активации сигнальных путей, ответственных за пролиферацию и выживание клеток в условиях стрессовых воздействий, HER2 способен также напрямую регулировать процесс программируемой клеточной гибели на различных уровнях. В данном обзоре проанализированы опубликованные работы, посвященные участию рецептора HER2 в различных сигнальных путях и его роли в регуляции апоптоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: HER2, рецептор эпидермального фактора роста, рак, PI3K-AKT сигнальный путь, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972520100152

ВВЕДЕНИЕ

HER2 (известный также как ERBB2, CD340 или протоонкоген Neu) является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Рецепторы HER принадлежат к семейству тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста, которые включают четыре рецептора HER1 (также известный как EGFR – рецептор эпидермального фактора роста), HER2 (ErbB2/Neu), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4) [1]. Белки рецепторов эпидермального фактора роста, как правило, имеют общую структуру и включают в себя внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен, локализующий рецептор в мембране, а также цитоплазматический тирозинкиназный домен, осуществляющий саму киназную активность (рис. 1). При этом показано, что HER3 характеризуется отсутствием киназной активности либо ее пониженным уровнем, в то время как для HER2 не обнаружено лиганда, который способен активировать данный рецептор. Большинство исследований сосредоточено на роли HER2 в развитии рака молочной железы (РМЖ) как *in vivo*, так и *in vitro*. Поскольку оверэкспрессия HER2 наблюдается ~ в 15–30% случаев РМЖ и является важным прогностическим биомаркером. Однако появляется все больше данных о повышенной экспрессии HER2 в других видах рака, например, при раке желудка и пищевода, яичников, эндометрии, мочевого пузыря, легких, толстой кишки, головы и шеи [2].

Принятые сокращения: РМЖ – рак молочной железы; HER2– рецептор эпидермального фактора роста человека 2; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PH – домен плекстрина; PDK1 – протеин серин/треонинкиназо-3′-фосфоинозитид-зависимая киназа 1; AKT– протеинкиназа B; HIF-1α – фактор, индуцируемый гипоксией 1; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; MAPK – митоген-активируемый протеинкиназный комплекс; DISC – комплекс, индуцирующий смерть; MEK – MAP киназа-ERK киназа; ERK1/2 – внеклеточные сигнально-регулируемые киназы; MAPKKK – митоген-активируемая протеинкиназа киназа киназ, MAPKK – митоген-активируемая протеинкиназа киназа, MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Каскад фосфорилирования, запускаемый автофосфорилированием рецептора HER2, способствует пролиферации клеток через передачу сигнала по PI3K/AKT-киназному пути на mTOR, который является мастер-регулятором метаболизма и аутофагии. Также было обнаружено, что активация HER2 приводит к подавлению апоптоза через изменение гомеостаза между Bcl-2 и BH3-only белками. Поэтому не удивительно, что члены семейства ERBB, включая HER2, часто сверхэкспрессированы и/или мутированы в различных типах рака и являются перспективными мишенями для создания противораковой терапии. В данном обзоре проведен анализ опубликованных работ, посвященных участию рецептора HER2 в различных сигнальных путях и его роли в регуляции апоптоза.

АКТИВАЦИЯ HER2

HER2 является терапевтической мишенью для лечения различных типов рака, включая рак молочной железы, яичников, легкого, желудка и других [2]. В настоящее время одобрены анти-HER2 препараты для лечения опухолей с оверэкспрессией HER2, включая моноклональные антитела трастузумаб и пертузумаб, а также низкомолекулярные ингибиторы рецепторов тироизинкиназ, таких как лапатиниб, нератиниб и пиротиниб. Помимо HER2-специфичной монотерапии, одобрены также различные комбинации совместной терапии, включающей трастузамаб, капецатабин (или 5-фторурацил) и цисплатин для лечения метастатического рака желудка и желудочно-кишечного тракта [3].

HER2 относят к т.н. «сиротским рецепторам», т.е. для них не известен или не существует специфический лиганд. Обычно связывание лиганда с рецептором запускает процесс его гомо- или гетеродимеризации и последующей активации. Однако известно, что в случае сверхэкспрессии HER2 в клетках образуются лиганд-независимые гомодимеры [4]. Показано также, что HER2 способен связываться с другими членами семейства рецепторов эпидермального фактора роста, что вносит значительный вклад в нарушение регуляции внутриклеточной передачи сигналов и роста клетки [5]. Так, например, показано, что HER2 способен взаимодействовать с другими членами суперсемейства тирозинкиназ, включая AXL, MET, RET и другие. Рецептор AXL также известен как Tyro7 и принадлежит к семейству тирозинкиназных рецепторов TAM (название дано по первым буквам трех членов семейства: Tyro3, Axl, and Mer) [6]. TAM-рецепторы выполняют важные функции во многих биологических процессах, таких как коагуляция, иммунный ответ и прогрессирование рака [7]. Исследования показали, что AXL может взаимодействовать с HER2 в клетках HER2-позитивного подтипа рака молочной железы. Этот факт дает основания предполагать, что совместное действие лапатиниба (низкомолекулярного ингибитора HER2) и ингибитора AXL окажется эффективным подходом [8]. Кроме того, для членов семейства EGFR, в т.ч. для HER2, показана возможность образовывать гетеродимеры с тирозинкиназами MET и RET, в результате чего активируются нижележащие сигнальные пути PI3K-AKT и MEK-ERK, способствующие пролиферации и выживанию (рис. 1) [9].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ PI3K-AKT

Множество исследований показало, что сигнальные пути в клетке высоко организованы и тонко регулируются. Активация сигнальных путей приводит к регуляции важнейших функций в жизнедеятельности клеток, таких как пролиферация, дифференцировка, клеточный цикл, выживание и метаболизм [4].

Одним из важнейших сигнальных путей, активируемых рецептором HER2, является сигнальный путь PI3K-AKT, отвечающий за активацию пролиферации, синтез белков и продвижение клетки по клеточному циклу, выживание в стрессовых условиях, а также ассоциированный с опухолевой трансформацией.

PI3K привлекается к активированному рецептору HER2 и фосфорилируется им. PI3K (фосфоинозитид-3-киназа) является членом семейства протеинкиназных ферментов, которая фосфорилирует фосфатидилинозитол в положении 3-гидроксильной группы инозитольного кольца. PI3K представляет собой гетеродимер, состоящий из регуляторной и каталитической субъединицы, и является ключевым элементом PI3K/AKT сигнального пути [10].

Как упоминалось ранее, активация тирозин-специфической протеинкиназной активности рецепторов приводит к их автофосфорилированию по остаткам тирозина. Эта пост-трансляционная модификация служит сигналом для привлечения PI3K ко внутренней мембране путем ее непосредственного связывания с консенсусными остатками фосфотирозинов в молекуле рецептора. Фосфотирозины могут также узнаваться с помощью одного из двух доменов SH2 в регуляторной субъединице PI3K. Релокализация PI3K к мембране активирует ее каталитическую субъединицу. Активация PI3K приводит к образованию вторичного мессенджера фосфатиди-

линозитол-3,4,5-трифосфата (PI3,4,5-P3) из субстрата фосфатидилинозитол-4,4-бифосфата (PI-4,5-P2). PI3,4,5-P3, в свою очередь, рекрутирует сигнальные белки, содержащие домены плекстрина (PH), на мембрану, включая протеин серин/треонинкиназо-3′-фосфоинозитид-зависимую киназу 1 (PDK1) и AKT (протеинкиназу B) [10, 11].

Известно несколько мишеней, которые получают сигналы по PI3K пути, но наиболее важным медиатором является протеинкиназа AKT [12]. Существует три типа AKT: AKT1, AKT2 и AKT3 [13–15]. Эти изоформы кодируются разными генами, но имеют общую консервативную доменную структуру, состоящую из амино-концевого домена (плекстрин гомологичного домена; PH-домен), киназного домена и карбокси-концевого регуляторного домена, содержащего гидрофобный мотив [15]. Сигнальный путь PI3K/AKT часто нарушается при злокачественных новообразованиях и в настоящее время рассматривается как важная противораковая мишень [16]. AKT способствует росту раковых клеток как за счет подавления экспрессии генов, отвечающих за клеточную смерть, так и за счет активации экспрессии генов, способствующих выживанию [17] (рис. 1). Показано, что AKT ингибирует экспрессию членов семейства транскрипционных факторов FKHR, FHHRL1 и AFX, участвующих в регуляции апоптоза. Также известно, что AKT ингибирует Bad, являющийся проапоптотическим членом семейства Bcl-2; киназу ASK1, которая, в свою очередь, активирует проапоптотические киназы JNK и p38 MAP; а также прокаспазу-9, которая играет важную роль в осуществлении сигнального пути апоптоза [18–20].

Мишенями AKT, которые способствуют выживанию клеток, также являются NF-κB и цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB [21, 22].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ PI3K-AKT-mTOR

Важно отметить, что сигнальный путь PI3K-AKT-mTOR, активируемый рецептором HER2, является одним из основных путей, регулирую-

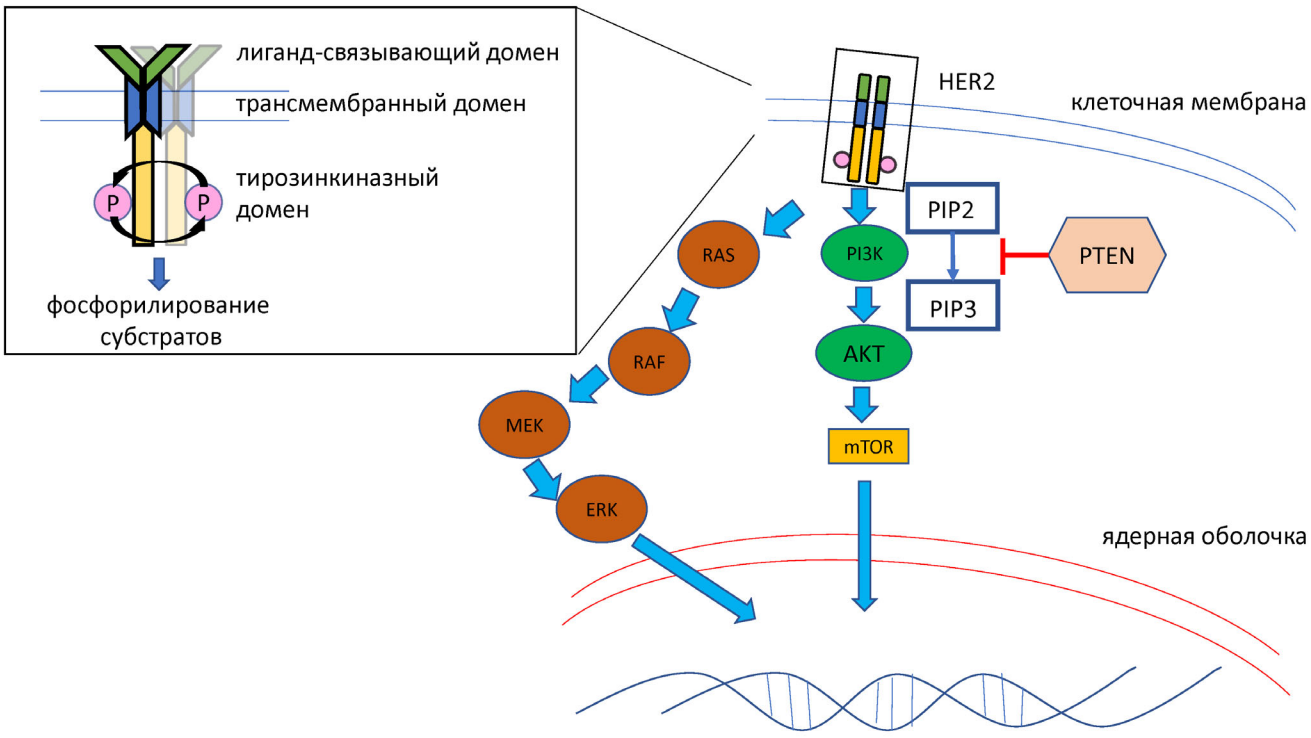


Рис. 1. Структура рецепторов семейства EGFR и основные активируемые HER2 сигнальные пути. Структура трансмембранного рецептора HER2 и других членов семейства EGFR включает внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен, локализующий рецептор в мембране, а также цитоплазматический тирозинкиназный домен, осуществляющий киназную активность. В результате гомо- или гетеродимеризации происходит фосфорилирование, обеспечивающее активацию рецептора. Активированный рецептор запускает сигнальные пути: сигнальный путь PI3K/AKT, сигнальный путь Ras-Raf-MEK-ERK. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

щих аутофагию при стрессе, например, при голодании, окислительном стрессе, инфекции, а также при подавлении опухолей [23]. Помимо HER2 и других членов семейства EGFR, mTOR активируется другими рецепторами факторов роста и их лигандами, такими как рецептор инсулиноподобного фактор роста-1 (IGF-1) – IFGR-1, а также рецептором фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), которые также передают сигналы mTOR через PI3K/AKT.

mTOR в клетке существует как субъединица внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов TORC1 и TORC2. Комплекс mTORC1 состоит из mTOR, Raptor, mLST8 и PRAS40. Он чувствителен к рапамицину и, следовательно, представляет собой мишень ингибиторов mTOR первого поколения. Он также активирует S6K и инактивирует 4EBP1, что приводит к трансляции белков и росту клеток [24]. Комплекс mTORC2 состоит из mTOR, Rictor, Sin1 и mLST8. Он менее чувствителен к рапамицину и его роль в нормальном функционировании клеток и онкогенезе до конца не ясна. Однако известно, что он активирует AKT, формируя петлю положительной обратной связи и тем самым способствуя пролиферации и выживанию клеток. Канонический путь активации mTOR зависит от передачи сигналов через PI3K/AKT, но известны и альтернативные не-AKT-зависимые пути активации, например, через путь Ras/MEK/ERK [25].

Также было показано, что AKT-зависимое фосфорилирование mTOR активирует экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1α), а также усиливает ангиогенез за счет активации экспрессии VEGF [26].

Обобщая биологическую роль AKT, стоит особо отметить, что она является одной из наиболее важных киназ, которая подавляет индукцию апоптоза. В результате множества исследований было показано, что мутации в AKT подавляют пролиферацию клеток, тогда как повышенная экспрессия AKT дикого типа подавляет апоптоз, запускаемый различными типами стресса [27, 28]. Например, активация PI3K/AKT сигнального пути приводит к транслокации FoxO белков из ядра и подавляет их транскрипционную активность [29, 30]. Показано, что AKT фосфорилирует два сайта у данных белков, один из которых находится в амино-концевой последовательности, а второй – в участке сигнала ядерной локализации (NLS) (T24 и S256 для FoxO1), что приводит к тому, что белки 14-3-3 узнают эти сайты и помогают экспорту форсфорилированных белков FoxO в цитозоль (рис. 2). Таким образом, AKT подавляет способность транскрипционных факторов FoxO активировать апоптоз, которому посвящена следующая глава, а также вызывать остановку клеточного цикла (через p21 и p27) и подавлять пролиферацию (через Sestrin3 MAP1LC3B и BNIP3) [31, 32].

PTEN является фосфатазой и ключевой молекулой, регулирующей сигнальный путь PI3K/AKT. PTEN дефосфорилирует липидные субстраты PI3,4,5-P3 и, тем самым, ингибирует проведение сигнала по PI3K/AKT пути (рис. 1). Не удивительно, что PTEN является супрессором опухолей, ингибируя рост клеток и повышая клеточную чувствительность к апоптозу, в т.ч. аноикису [33]. Важно отметить, что PTEN часто инактивирован при злокачественных новообразованиях как за счет мутаций, так и с помощью других механизмов, включая метилирование промотора, микро-РНК-интерференцию, фосфорилирование и изменение локализации [34–38].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ Ras-Raf-MAPK-MEK-ERK

Митоген-активируемый протеинкиназный (MAPK) путь является одним из сложных взаимосвязанных сигнальных каскадов, который участвует в онкогенезе, прогрессировании опухоли, а также в развитии лекарственной устойчивости. При активации данного сигнального пути происходит амплификация ключевых белков, отвечающих за пролиферацию, рост и выживание [39]. Как правило, после активации рецепторов тирозинкиназ происходит трансдукция сигнала через цитозольные интермедиаторы, которые регулируют транксрипцию или трансляцию эффекторных генов [40]. В первую очередь, участвуют интермедиаторы RAS ГТФаз при активации пути MAPK. RAS ГТФазы насчитывают около 150 малых G-белков, которые передают сигнал внутрь клетки. Среди наиболее известных выделяют HRAS, KRAS, NRAS [41]. После димеризации HER2 внутриклеточные домены рецептора образуют докинг-сайты, с которыми могут взаимодействовать адапторные белки. В случае активации RAS с докинг-сайтами связываются адапторные белки Grb2 и Shc, через которые происходит взаимодействие с фактором обмена гуанина Sos, в свою очередь, привлекающим ГТФазу RAS [42]. После активации RAS передает сигнал на нижестоящий эффектор RAF, который зависит от взаимодействия с активированным RAS. Семейство RAF включает несколько вариантов (к примеру, ARAF, BRAF, CRAF) [43], каждый из которых состоит из серин/треонин киназ, ответственных

за активацию пути MEK (MAP kinase-ERK kinase) и ERK1/2 (внеклеточные сигнально-регулируемые киназы). Каскад активации происходит в следующем порядке: MAPKKK (митоген-активируемая протеинкиназа киназа киназ, представленная RAF и ее вариантами), за которой следует MAPK киназа (MAPKK: MEK1/2/3/4/5/6/7) и в самом конце MAPK (рис. 1). Существует три основных классических MAPK с различными изоформами ERK (с изоформами ERK1 и ERK2), JNK (*N*-концевые киназы c-Jun и его изоформы JNK1, JNK2 и JNK3) и MAPK p38 (p38α, p38β, p38γ и p38δ). Как MEK, так и ERK1/2 участвуют в важнейших процессах жизнедеятельности клетки, таких как выживание, пролиферация и дифференцировка [44, 45]. Таким образом, активируя данный сигнальный каскад, HER2 участвует в регуляции перечисленных выше клеточных процессов.

УЧАСТИЕ HER2 В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

Помимо активации сигнальных путей, ответственных за пролиферацию и выживание клеток в условиях стрессовых воздействий, HER2 способен также напрямую регулировать процесс программируемой клеточной гибели на различных уровнях.

Как известно, одним из ключевых этапов запуска апоптоза является активация проапоптотических факторов семейства BCL-2: Bax и Bak, относящихся к подсемейству BH1-3 [46]. Данные белки обеспечивают проницаемость наружной мембраны митохондрий (MOMP) и выход цитохрома *c* с последующим встраиванием его в структуру апоптосомы [47]. Способность Bax и Bak выполнять проапоптотические функции подавляется членами того же белкового семейства BCL-2: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 (подсемейство BH1-4) и активируется факторами Puma, Noxa, Bid, Bim и др. (подсемейство BH3-only). Антиапоптотические белки подсемейства BH1-4 связываются с белками Bax и Bak, что препятствует их активации и образованию пор, необходимых для выхода цитохрома *c* из интермембранного пространства митохондрий (рис. 2) [48].

Согласно современным представлениям, при реализации внутреннего (или митохондриального) пути апоптоза воздействие различных стрессовых стимулов на клетку приводит к активации экспрессии таких проапоптотических белков, как Puma, Bax, Noxa, Bim, например, за счет транскрипционных факторов p53, p63, p73, c-Myc и др. [49–53]. Как было упомянуто выше, в результате активации Bax и Bak образуют поры во внешней мембране митохондрий, обеспечивающие высвобождение цитохрома *c* [54]. Цитохром *c*, в свою очередь, ассоциируется с бел-

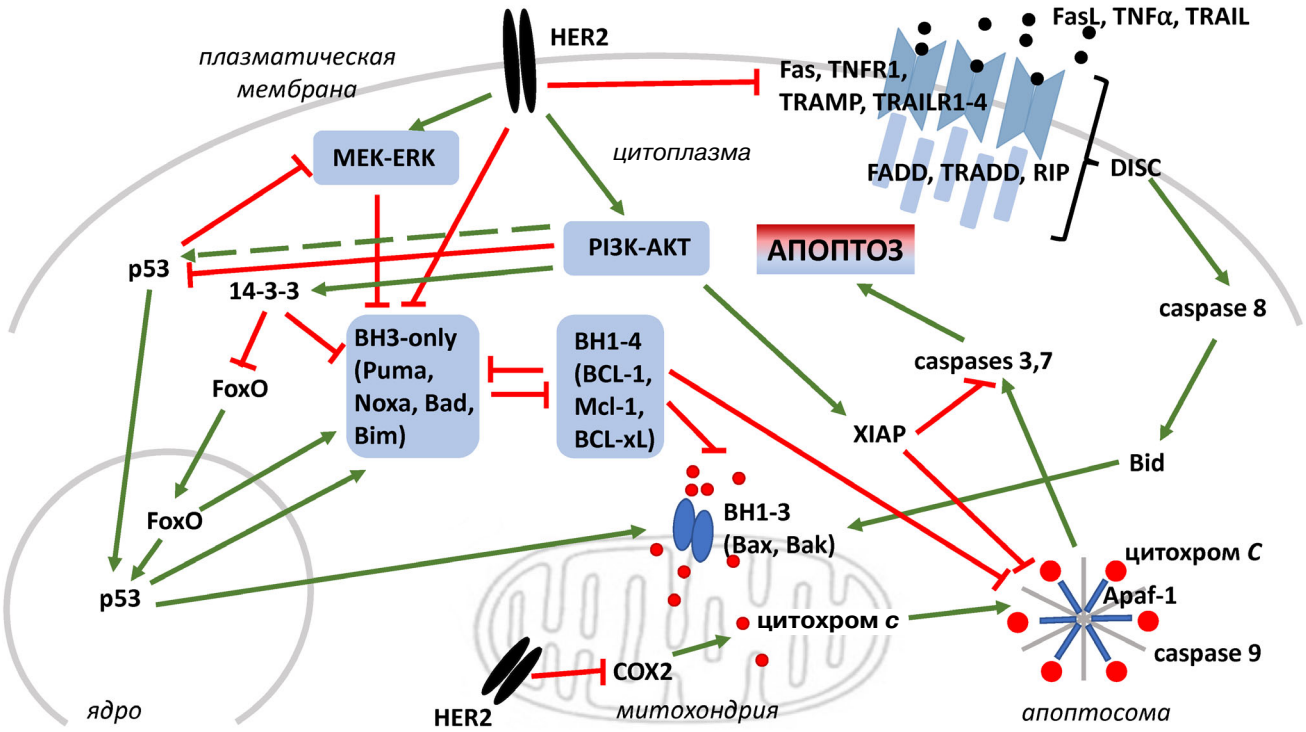


Рис. 2. Участие HER2 в регуляции апоптоза

ками Apaf-1 и прокаспазой-9, образуя белковый комплекс апоптосомы. Активированная каспаза 9 в составе апоптосомы осуществляет процессинг прокаспаз-3, -7 и -6 (рис. 2) [55].

Внешний путь апоптоза инициируется связыванием лигандов с т.н. «рецепторами смерти» (Death receptors), к которым относятся такие рецепторы, как Fas, TNFR1, TRAMP, TRAILR1-4 и др. Для большинства из них известны соответствующие лиганды, такие как TNF, FasL, TRAIL, связывание с которыми приводит к привлечению в комплекс одного или нескольких адапторных белков FADD, TRADD или RIP. В результате формируется сигнальный комплекс, индуцирующий смерть (DISC), который осуществляет процессинг прокаспазы-8 и последующую активацию каспаз-3, -7 и -6. Также DISC отвечает за активацию процессинга BH3-only белка tBid с образованием его активной формы Bid, способной подавлять антиапоптотическую функцию белков подсемейства BH1-4, а также активировать индуктор апоптоза Bax и участвовать в формировании пор во внешней мембране митохондрий для выхода цитохрома *c* (рис. 2) [56.] В конечном итоге оба пути апоптоза приводят к тому, что активированные каспазы-3, -7 и -6 осуществляют протеолиз множества субстратов, вызывающий фрагментацию ДНК, разрушение цитоскелета, дестабилизацию межклеточных контактов и образование апоптотических телец.

Как было описано выше, HER2-активируемый сигналинг направлен на активацию таких туморогенных процессов, как пролиферация, метастазирование и формирование лекарственной устойчивости за счет повышения выживаемости клеток под воздействием стрессовых факторов. Помимо этого, HER2 как напрямую, так и опосредованно влияет на молекулярные пути, ответственные за запуск апоптоза в клетках.

ВЛИЯНИЕ HER2 НА ПРОАПОПТОТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ Bim, Puma, Noxa И Bad

Было показано, что подавление HER2 с помощью специфического низкомолекулярного ингибитора лапатиниба приводит к активации BH3-only белков Puma и Bim, и, соответственно, последующему запуску процесса апоптоза [57]. Лапатиниб является тирозинкиназным ингибитором, препятствующим как гомодимеризации HER2, так и гетеродимеризации HER2 и EGFR, предотвращая таким образом активацию нижележащих сигнальных каскадов MEK-ERK и PI3K/AKT [58] (рис. 2). Инактивация HER2 с помощью лапатиниба приводит к снижению активности PI3K/AKT сигналинга, что, в свою очередь, способствует диссоциации белкового комплекса FoxO-14-3-3. Высвобождение транскрипционного фактора FoxO делает возможной его транслокацию в ядро, где он активирует экспрессию гена *BBC3*, кодирующего белок Puma [59, 60] (рис. 2). Несмотря на то, что Bim также является транскрипционной мишенью FoxO [61], было показано, что лапатиниб-индуцируемая активация Bim происходит главным образом за счет подавления MEK-ERK сигнального каскада [57]. Активированная киназа ERK фосфорилирует фактор Bim, что способствует его убиквитинированию и протеасомной деградации [62, 63]. Таким образом, подавление HER2 и, соответственно, ERK приводит к стабилизации Bim и способствует активации апоптоза (рис. 2).

Кроме того, было показано, что HER2 способен физически взаимодействовать с белком Puma и фосфорилировать его по трем тирозиновым остаткам. Данные модификации приводят к дестабилизации белка Puma в клетках рака молочной железы за счет протеасомной деградации и, как следствие, подавлению апоптоза (рис. 2) [64].

Анализ пациентов с HER2-позитивной формой РМЖ показал, что амплификация HER2 ассоциирована с подавлением экспрессии проапоптотического белка Noxa, принадлежащего к BH3-only подсемейству [65]. Авторы данного исследования изначально предположили, что HER2 может опосредованно подавлять транскрипцию гена *PMAIP1* (Noxa), однако данная гипотеза не подтвердилась. Оказалось, что нетранслируемая область гена *ERBB* содержит ген микроРНК, *miR-4728*, мишенью которой является эстрогеновый рецептор ERα, который, в свою очередь, активирует экспрессию Noxa [66, 67]. Таким образом, амплификация HER2 в раковых клетках неизбежно приводит к повышению экспрессии miR-4728 и, следовательно, к снижению уровня Noxa в клетках, что является одним из механизмов, обеспечивающих HER2-зависимое подавление апоптоза (рис. 2).

Еще одним членом подсемейства BH3-only является белок Bad. При активации апоптотического каскада его основная функция заключается в конкурентном связывании антиапоптотических белков подсемейства BH1-4 (Bcl-2, Bcl-xL), в результате чего происходит высвобождения Bax и Bak из инактивирующего комплекса и формирование пор во внешней мембране митохондрий для выхода цитохрома *c* [68, 69]. Фосфорилирование Bad за счет киназ AKT и ERK, активируемыми HER2, приводит к связыванию Bad с белком 14-3-3, в результате чего данный

белок не способен разрушать ингибирующие межбелковые взаимодействия Bcl-2 и Bcl-xL со своими проапоптотическими мишенями и, соответственно, участвовать в запуске апоптоза [68]. Таким образом, активация фосфорилирования Bad за счет AKT и ERK является еще одним механизмом HER2-зависимой регуляции запрограммированной клеточной гибели (рис. 2).

Вышеописанные механизмы HER2-опосредованной регуляции белков семейства BCL-2 обеспечивают антиапоптотическую функцию данного рецептора и были исследованы главным образом в клетках рака молочной железы. Учитывая, что амплификация HER2 характерна и для других типов опухолей, можно предположить возможную универсальность данных молекулярных путей, однако для определения влияния HER2 на проапоптотические белки BCL-2 семейства в клетках других типов рака необходимы дополнительные исследования.

HER2 И COX2

Показано, что помимо локализации на плазматической мембране и в ядре, для рецептора HER2 также характерно расположение на внутренней мембране митохондрий. Предполагается, что митохондриальная фракция HER2 регулирует активность электрон-транспортной цепи и энергетический метаболизм клетки [70, 71]. Кроме того, показано, что HER2, локализованный в митохондриях, способен подавлять активность цитохрома *c* оксидазы COX2, необходимой для окисления цитохрома *c*, предшествующего его высвобождению из интер-мембранного пространства митохондрий [70]. Таким образом, HER2 подавляет образование активной окисленной формы цитохрома *c*, необходимой для сборки апоптосомы и запуска запрограммированной клеточной гибели (рис. 2).

HER2 И РЕЦЕПТОРЫ СМЕРТИ

В настоящее время показано, что HER2 способен регулировать как внешний, так и внутренний пути активации апоптоза.

Так, было продемонстрировано, что ингибирование фосфорилирования HER2 и EGFR с помощью тирозинкиназного ингибитора гефитиниба в клетках аденокарциномы с оверэкспрессией HER2 вызывает повышение экспрессии и мембранной локализации рецептора смерти FAS, сопровождающееся активацией как внутреннего, так и внешнего путей апоптоза [72] (рис. 2). Гипотезу о том, что HER2 подавляет экспрессию и активацию рецептора FAS также подтверждает исследование влияния гликоалкалоида соламаргина на клетки рака легкого. Обработка клеток данным веществом приводит к одновременному снижению экспрессии HER2 и повышению уровня FAS, а также способствует повышению чувствительности клеток к цитотоксическому препарату эпирубицину [73].

На клеточных моделях нескольких типов рака было показано, что оверэкспрессия HER2 приводит к снижению цитотоксического эффекта рекомбинантного TNFα – лиганда рецептора смерти TNFR. Таким образом, по-видимому, HER2 подавляет TNFα-индуцируемый апоптоз, а также обеспечивает защиту раковых клеток от уничтожения макрофагами (рис. 2) [74, 75].

Важно отметить, что клетки HER2-позитивного рака молочной железы с приобретенной устойчивостью к низкомолекулярному ингибитору HER2, лапатинибу, демонстрируют повышенную чувствительность к обработке лигандом рецепторов TRAILR. При этом было показано, что чувствительность к TRAIL приобретается только клетками, в которых снижен уровень фосфорилированной киназы AKT [76]. Эффект HER2 на апоптотический каскад, запускаемый взаимодействием рецепторов TRAILR с соответствующим лигандом, скорее всего, зависит от клеточного контекста. Так, было показано, что подавление активации HER2 с помощью моноклонального антитела трастузумаба приводило к повышению уровня TRAIL-индуцируемого апоптоза в клеточной линии РМЖ HER2-позитивного подтипа SKBR3, но не в BT-474 [77].

HER2 И КАСПАЗЫ

Активация каспаз является одним из ключевых этапов запрограммированной клеточной гибели по пути апоптоза. При анализе панели HER2-экспрессирующих клеточных линий человека различных типов рака было показано, что повышенная экспрессия HER2 ассоциирована со сниженным уровнем каспаз 8 и 3 (рис.2) [78]. Кроме того, HER2 способен опосредованно воздействовать на активность каспаз 9, 3 и 7 за счет активации киназы AKT. Фосфорилирование AKT приводит к стабилизации белка XIAP, относящегося к группе ингибиторов апоптоза (IAP) [79]. Белок XIAP, в свою очередь, осуществляет свою функцию, предотвращая процессинг каспаз 9, 3 и 7 и подавляя главным образом внутренний путь апоптоза (рис. 2) [80]. Также было показано, что AKT способен непосредственно фосфорилировать каспазу 9, что приводит к сниже-

нию ее протеазной активности и вызывает снижение уровня апоптоза (рис. 2) [18].

Любопытен тот факт, что белок HER2 сам является субстратом для расщепления каспазами. Так, было показано, что HER2 может гидролизоваться каспазами с образованием фрагмента 25 кДа, включающего BH3-подобный домен, сходный по структуре с BH3-доменом белков семейства BCL-2 [81]. При этом было продемонстрировано, что данный белковый фрагмент способен выполнять функции, характерные для проапоптотических факторов подсемейства BH3-only, а именно ингибитовать Bcl-xL, способствовать активации Noxa и выходу цитохрома *c* [81]. Несмотря на то, что данная работа демонстрирует потенциальный механизм, за счет которого HER2 способен выполнять функцию проапоптотического фактора, до сих пор не показано, подвергается ли данному процессингу каспазами эндогенный HER2.

HER2 И МАСТЕР-РЕГУЛЯТОР АПОПТОЗА p53

Сложно переоценить значение белка p53 для клетки. Этот короткоживущий транскрипционный фактор стабилизируется в клетке в ответ на различные формы стресса и активирует экспрессию множества белков, в том числе играющих ключевые роли в запуске и реализации апоптоза, таких как Puma, Bax, Noxa [82].

На сегодняшний день не показано физического взаимодействия между белками HER2 и p53, однако HER2 способен опосредованно влиять на активность p53 через активацию двух главных HER2-зависимых сигнальных путей – MEK-ERK и PI3K-AKT.

Так, было показано, что оверэкспрессия HER2 в клетках РМЖ подавляет активность p53 дикого типа за счет MEK-ERK и PI3K-AKT сигнальных каскадов, при этом данный эффект не наблюдался в клетках с мутантной формой p53 [83].

Необходимо отметить, что в настоящее время в ряде исследований на клетках рака легкого показана также потенциальная возможность положительного влияния HER2 на p53 за счет его активации с помощью MEK-ERK сигнального пути, в результате чего происходит повышение экспрессии p53-зависимых генов, принимающих участие в остановке клеточного цикла и запуске апоптоза [84, 85]. Еще одним потенциальным механизмом HER2-индуцируемого повышения транскрипционной активности p53 является активация киназы DAPK (death-associated protein kinase) за счет сигнального пути MEK-ERK. Так, киназа DAPK является индуктором апоптоза и аутофагии, стабилизирующим белок p53 и способствующим активации его мишеней [86]. Сама DAPK-киназа фосфорилируется и активируется MEK-ERK каскадом, при этом активированная киназа DAPK подавляет транслокацию фосфорилированной формы ERK в ядро, препятствуя таким образом активации ядерных субстратов ERK, например, таких как Fos, Jun и Myc [87].

HER2-индуцируемый сигнальный каскад PI3K-AKT также участвует в регуляции активности p53. На клетках эмбриональной почки человека HEK293 было показано, что киназа AKT способна фосфорилировать главный негативный регулятор p53 – убиквитинлигазу MDM2 в двух положениях Ser166 и Ser186. Эти модификации приводят одновременно к транслокации MDM2 в ядро и стабилизации MDM2 за счет подавления авто-убиквитинирования [88].

При воздействии стресса на клетки стабилизация и активация p53 сопровождается активацией PTEN и деградацией AKT в протеасомах. Интересно, что PTEN физически взаимодействует с p53, способствует его ацетилированию, тетрамеризации и связыванию с ДНК, что приводит к усилению транскрипционной активности p53. С использованием различных клеточных моделей было показано, что взаимодействие PTEN-p53 подавляет MDM2-опосредованное ингибирование p53. Кроме того, другая группа исследователей показала, что PTEN способен подавлять транскрипцию MDM2, что, в свою очередь, приводит к стабилизации p53 [89].

Повышение экспрессии и активности HER2 приводит к активации PI3K-AKT каскада в клетках различных типов рака, в результате чего за счет MDM2-опосредованной деградации снижается уровень p53 и его транскрипционных мишеней [90]. Кроме того, данный эффект может усиливаться через дополнительный ARF-зависимый механизм: было показано, что при оверэкспрессии HER2 и активации AKT в клетках снижается уровень негативного регулятора MDM2 – белка ARF, препятствующего ассоциации MDM2 с p53 [91].

Необходимо отметить, что, как и в случае с MEK-ERK сигнальным каскадом, сигнальный каскад PI3K-AKT может как подавлять, так и стимулировать активацию p53. Так, недавно было продемонстрировано, что в результате AKT-зависимого фосфорилирования белка MAZ, являющегося транскрипционным репрессором p53, данный белок диссоциирует с промоторной областью p53, в результате чего экспрессия p53 и его транскрипционных мишеней повышается [92].

Приведенные в данной главе научные исследования иллюстрируют амбивалентную роль

HER2 в регуляции активности p53. Результаты были получены авторами на различных клеточных моделях, что позволяет нам лишь предполагать универсальность приведенных молекулярных механизмов. Однако уже сейчас можно за-ключить, что, по-видимому, существует тонкий регуляторный баланс HER2-индуцируемых факторов, который, сдвигаясь либо в одну, либо в другую сторону, может либо стимулировать, либо подавлять активность p53. Примеры подобной тонкой регуляции встречаются в биологии рака довольно часто, и все они свидетельствуют о необходимости молекулярного профилирования каждого конкретного типа опухоли, а в наилучшем случае – опухоли от каждого пациента, для выбора оптимального сочетания таргетных препаратов и цитостатической/цитотоксической терапии.

HER2 И МУТАНТНЫЙ p53

Как было упомянуто ранее, белок p53 является одним из важнейших факторов, отвечающих за запуск апоптоза, который, в свою очередь, обеспечивает механизм защиты организма против канцерогенеза. Согласно исследованиям образцов опухолей РМЖ с применением полногеномного секвенирования, частота мутаций в гене *Tp53* составляет приблизительно 30%. При этом для HER2-позитивных опухолей доля образцов, несущих мутации в гене *TP53*, составляет уже 70% [93].

Мы предполагаем, что существует механизм, за счет которого мутантные формы p53, обладающие собственной транскрипционной активностью и, как правило, осуществляющие онкогенные функции, активируют экспрессию HER2 и таким образом стимулируют активность его мишеней. При этом на сегодняшний день имеется гораздо меньше данных, свидетельствующих об обратной связи. Однако неоднократно показано, что повышенный уровень HER2 ассоциируется с высокой экспрессией mutp53 [94]. Кроме того, недавнее исследование показало, что подавление активности HER2 с помощью ингибитора лапатиниба приводит к MDM2-зависимой деградации mutp53 и снижению экспрессии его транскрипционной мишени HSF1 [95]. По-видимому, между HER2 и mutp53 существует цикл обратной позитивной регуляции, что усиливает онкогенные свойства обоих белков.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данном обзоре рассмотрены молекулярные механизмы, ответственные за участие рецептора HER2 в регуляции апоптоза. Не будет преувеличением сказать, что подавляющее число активностей HER2 направлено на прямое или опосредованное подавление активности апоптотических или проапоптотических факторов и препятствование запуску запрограммированной клеточной гибели. Подавление апоптоза является одним из признаков раковой клетки согласно широко признанной концепции [96]. Действительно, на сегодняшний день HER2 рассматривается как онкоген и в настоящее время разрабатывается множество вариантов HER2-направленной противоопухолевой терапии. При этом невозможно не упомянуть о нескольких исключениях. Так, например, HER2 способен стимулировать экспрессию p53, а продукт его расщепления каспазами потенциально способен выполнять функции BH3-only подсемейства белков [81, 92].

Несмотря на десятилетия исследований и значительный прогресс в данной области, проблема резистентности HER2-позитивного типа опухолей к химиотерапии, а также приобретаемой устойчивости к анти-HER2 препаратам все еще актуальна [97]. Учитывая разнонаправленное влияние HER2 на клетку, а также способность данного белка к гетеродимеризации с другими тирозинкиназными рецепторами, неудивительно, что раковая клетка преодолевает действие HER2-направленных ингибиторов за счет обходных компенсаторных механизмов. Наиболее перспективной на сегодняшний день стратегией подавления роста HER2-позитивных опухолей представляется сочетанная терапия, включающая одновременно анти-HER2 препараты и цитотоксические вещества, вызывающие смерть раковой клетки. К данной стратегии также можно отнести и конъюгаты антител и низкомолекулярных цитотоксических препаратов, два из которых – трастузумаб/дерукстекан и трастузумаб/эмтанзин – в настоящее время уже одобрены FDA (Food and Drug Administration) [98, 99]. Кроме того, в настоящее время появляется все больше исследований, демонстрирующих эффективность сочетания ингибиторов HER2 с ингибиторами других киназ, что также подтверждает мнение о перспективности подавления компенсаторных механизмов, активирующихся при подавлении HER2 [97, 100].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 19-75-10059), РФФИ (грант 18-315-20013 мол_а_вед) и гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых

в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях, подведомственных Федеральному агентству научных организаций, и государственных научных центрах Российской Федерации (14.W03.31. 0029).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Ferguson, K. M. (2014) The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, a020768, doi: 10.1101/cshperspect.a020768.
2. Iqbal, N., and Iqbal, N. (2014) Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications, *Mol. Biol. Intern.*, **2014**, 852748, doi: 10.1155/2014/852748.
3. Tompa, R. (2018) FDA Approves trastuzumab biosimilar, *Cancer Discov.*, **8**, 130, doi: 10.1158/2159-8290.cd-nb2017-183.
4. Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signaling network, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 127-137, doi: 10.1038/35052073.
5. Bertelsen, V., and Stang, E. (2014) The mysterious ways of ErbB2/HER2 trafficking, *Membranes*, **4**, 424-446, doi: 10.3390/membranes4030424.
6. Lai, C., and Lemke, G. (1991) An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system, *Neuron*, **6**, 691-704, doi: 10.1016/0896-6273(91)90167-x.
7. Lemke, G. (2013) Biology of the TAM receptors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a009076, doi: 10.1101/cshperspect.a009076.
8. Liu, L., Greger, J., Shi, H., Liu, Y., Greshock, J., Annan, R., Halsey, W., Sathe, G. M., Martin, A. M., and Gilmer, T. M. (2009) Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL, *Cancer Res.*, **69**, 6871-6878, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4490.
9. Tanizaki, J., Okamoto, I., Sakai, K., and Nakagawa, K. (2011) Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification, *Br. J. Cancer*, **105**, 807-813, doi: 10.1038/bjc.2011.322.
10. Fruman, D. A., Meyers, R. E., and Cantley, L. C. (1998) Phosphoinositide kinases, *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 481-507, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.481.
11. Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer, *Cancer Treat. Rev.*, **30**, 193-204, doi: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007.
12. Guo, H., German, P., Bai, S., Barnes, S., Guo, W., et al. (2015) The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma, *J. Genet. Genomics*, **42**, 343-353, doi: 10.1016/j.jgg.2015.03.003.
13. Jones, P. F., Jakubowicz, T., and Hemmings, B. A. (1991) Molecular cloning of a second form of rac protein kinase, *Cell Regul.*, **2**, 1001-1009, doi: 10.1091/mbc.2.12.1001.
14. Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., and Hemmings, B. A. (1991) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4171-4175, doi: 10.1073/pnas.88.10.4171.
15. Masure, S., Haefner, B., Wesselink, J. J., Hoefnagel, E., Mortier, E., et al. (1999) Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3, *Eur. J. Biochem.*, **265**, 353-360, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00774.x.
16. Thorpe, L. M., Yuzugullu, H., and Zhao, J. J. (2015) PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 7-24, doi: 10.1038/nrc3860.
17. Nicholson, K. M., and Anderson, N. G. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cell. Signal.*, **14**, 381-395, doi: 10.1016/s0898-6568(01)00271-6.
18. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., et al. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science*, **282**, 1318-1321, doi: 10.1126/science.282.5392.1318.
19. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell*, **91**, 231-241, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80405-5.
20. Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F., and Chao, M. V. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 893-901, doi: 10.1128/mcb.21.3.893-901.2001.
21. Du, K., and Montminy, M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB, *J. Biol. Chem.*, **273**, 32377-32379, doi: 10.1074/jbc.273.49.32377.
22. Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase, *Nature*, **401**, 82-85, doi: 10.1038/43466.
23. Levine, B., and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease, *Cell*, **132**, 27-42, doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
24. Hay, N., and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev.*, **18**, 1926-1945, doi: 10.1101/gad.1212704.
25. Memmott, R. M., and Dennis, P. A. (2009) Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer, *Cell. Signal.*, **21**, 656-664, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.01.004.
26. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.-M., Simons, J. W., and Semenza, G. L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res.*, **60**, 1541-1545.
27. Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffer, P., Downward, J., and Evan, G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB, *Nature*, **385**, 544-548, doi: 10.1038/385544a0.
28. Manning, B. D., and Toker, A. (2017) AKT/PKB signaling: navigating the network, *Cell*, **169**, 381-405, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
29. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., et al. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell*, **96**, 857-868, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80595-4.

30. Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L., and Burgering, B. M. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B, *Nature*, **398**, 630-634, doi: 10.1038/19328.
31. Van der Vos, K. E., and Coffer, P. J. (2011) The extending network of FOXO transcriptional target genes, *Antiox. Redox Signal.*, **14**, 579-592, doi: 10.1089/ars.2010.3419.
32. Webb, A. E., and Brunet, A. (2014) FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 159-169, doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.003.
33. Lu, Y., Lin, Y. Z., LaPushin, R., Cuevas, B., Fang, X., et al. (1999) The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells, *Oncogene*, **18**, 7034-7045, doi: 10.1038/sj.onc.1203183.
34. Kim, H., Huang, W., Jiang, X., Pennicooke, B., Park, P. J., and Johnson, M. D. (2010) Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2183-2188, doi: 10.1073/pnas.0909896107.
35. Molina, J. R., Morales, F. C., Hayashi, Y., Aldape, K. D., and Georgescu, M. M. (2010) Loss of PTEN binding adapter protein NHERF1 from plasma membrane in glioblastoma contributes to PTEN inactivation, *Cancer Res.*, **70**, 6697-6703, doi: 10.1158/0008-5472.can-10-1271.
36. Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., and Pandolfi, P. P. (2010) A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology, *Nature*, **465**, 1033-1038, doi: 10.1038/nature09144.
37. Silva, A., Yunes, J. A., Cardoso, B. A., Martins, L. R., Jotta, P. Y., et al. (2008) PTEN post-translational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability, *J. Clin. Invest.*, **118**, 3762-3774, doi: 10.1172/jci34616.
38. Wiencke, J. K., Zheng, S., Jelluma, N., Tihan, T., Vandenberg, S., et al. (2007) Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma, *Neuro Oncol.*, **9**, 271-279, doi: 10.1215/15228517-2007-003.
39. Plotnikov, A., Flores, K., Maik-Rachline, G., Zehorai, E., Kapri-Pardes, E., et al. (2015) The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target, *Nat. Commun.*, **6**, 6685, doi: 10.1038/ncomms7685.
40. Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 50-83, doi: 10.1128/mmbr.00031-10.
41. Johnson, D. S., and Chen, Y. H. (2012) Ras family of small GTPases in immunity and inflammation, *Curr. Opin. Pharm.*, **12**, 458-463, doi: 10.1016/j.coph.2012.02.003.
42. Hsu, J. L., and Hung, M.-C. (2016) The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer, *Cancer Metast. Rev.*, **35**, 575-588, doi: 10.1007/s10555-016-9649-6.
43. Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., and Kolch, W. (2011) Raf family kinases: old dogs have learned new tricks, *Genes Cancer*, **2**, 232-260, doi: 10.1177/1947601911407323.
44. Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., et al. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF, *Cell*, **65**, 663-675, doi: 10.1016/0092-8674(91)90098-j.
45. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., et al. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 1263-1284, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.
46. Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., et al. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science*, **292**, 727-730, doi: 10.1126/science.1059108.
47. Peña-Blanco, A., and García-Sáez, A. J. (2018) Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis, *FEBS J.*, **285**, 416-431.
48. Roufayel, R. (2016) Regulation of stressed-induced cell death by the Bcl-2 family of apoptotic proteins, *Mol. Membrane Biol.*, **33**, 89-99, doi: 10.1111/febs.14186.
49. Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., and Strasser, A. (2003) p53-and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa, *Science*, **302**, 1036-1038, doi: 10.1126/science.1090072.
50. Toshiyuki, M., and Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell*, **80**, 293-299, doi: 10.1016/0092-8674(95)90412-3.
51. Muthalagu, N., Junttila, M. R., Wiese, K. E., Wolf, E., Morton, J., et al. (2014) BIM is the primary mediator of MYC-induced apoptosis in multiple solid tissues, *Cell Rep.*, **8**, 1347-1353, doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.057.
52. Jacobs, W. B., Govoni, G., Ho, D., Atwal, J. K., Barnabe-Heider, F., et al. (2005) p63 is an essential proapoptotic protein during neural development, *Neuron*, **48**, 743-756, doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.027.
53. Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., et al. (2004) p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation, *J. Biol. Chem.*, **279**, 8076-8083, doi: 10.1074/jbc.M307469200.
54. Westphal, D., Kluck, R., and Dewson, G. (2014) Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis, *Cell Death Differ.*, **21**, 196-205.
55. Dorstyn, L., Akey, C. W., and Kumar, S. (2018) New insights into apoptosome structure and function, *Cell Death Differ.*, **25**, 1194-1208, doi: 10.1038/s41418-017-0025-z.
56. Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P. H. (2005) Death receptor signaling, *J. Cell Sci.*, **118**, 265-267, doi: 10.1242/jcs.01610.
57. Bean, G. R., Ganesan, Y. T., Dong, Y., Takeda, S., Liu, H., et al. (2013) PUMA and BIM are required for oncogene inactivation-induced apoptosis, *Sci. Signal.*, **6**, 20, doi: 10.1126/scisignal.2003483.
58. Kanat, O., Ertas, H., and Caner, B. (2018) Dual HER2 inhibition strategies in the management of treatment-refractory metastatic colorectal cancer: history and status, *World J. Clin. Cases*, **6**, 418.
59. Tzivion, G., Dobson, M., and Ramakrishnan, G. (2011) FoxO transcription factors; regulation by AKT and 14-3-3 proteins, *Biochim. Bioph. Acta*, **1813**, 1938-1945, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.06.002.
60. You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., et al. (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal, *J. Exp. Med.*, **203**, 1657-1663, doi: 10.1084/jem.20060353.
61. Gilley, J., Coffer, P. J., and Ham, J. (2003) FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons, *J. Cell Biol.*, **162**, 613-622.
62. Akiyama, T., Dass, C. R., and Choong, P. F. (2009) Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes, *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 3173-3180, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0685.

63. Wan, L., Tan, M., Yang, J., Inuzuka, H., Dai, X., et al. (2014) APCCdc20 suppresses apoptosis through targeting Bim for ubiquitination and destruction, *Dev. Cell*, **29**, 377-391, doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.022.
64. Carpenter, R. L., Han, W., Paw, I., and Lo, H.-W. (2013) HER2 phosphorylates and destabilizes pro-apoptotic PUMA, leading to antagonized apoptosis in cancer cells, *PLoS One*, **8**, e78836, doi: 10.1371/journal.pone.0078836.
65. Floros, K. V., Song, K.-A., Lochmann, T. L., Hughes, M. T., Heisey, D. A., et al. (2017) Deficient NOXA in HER2-amplified breast cancer drives kinase inhibitor resistance, *Proc. 105th Ann. Meeting Am. Assoc. Cancer Res.*, **77**, 3082, doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-3082.
66. Floros, K. V., Lochmann, T. L., Hu, B., Monterrubio, C., Hughes, M. T., et al. (2018) Coamplification of miR-4728 protects HER2-amplified breast cancers from targeted therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2594-2603, doi: 10.1073/pnas.1717820115.
67. Liu, W., Swetzig, W. M., Medisetty, R., and Das, G. M. (2011) Estrogen-mediated upregulation of Noxa is associated with cell cycle progression in estrogen receptor-positive breast cancer cells, *PLoS One*, **6**, e29466, doi: 10.1371/journal.pone.0029466.
68. Pandey, V., Zhu, T., Ma, L., and Lobie, P. E. (2018) Bad phosphorylation as a target of inhibition in oncology, *Cancer Lett.*, **415**, 177-186, doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.017.
69. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J. M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 49-63, doi: 10.1038/nrm3722.
70. Ding, Y., Liu, Z., Desai, S., Zhao, Y., Liu, H., et al. (2012) Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism, *Nat. Commun.*, **3**, 1-12, doi: 10.1038/ncomms2236.
71. Rohlenova, K., Sachaphibulkij, K., Stursa, J., Bezawork-Geleta, A., Blecha, J., et al. (2017) Selective disruption of respiratory supercomplexes as a new strategy to suppress Her2^{high} breast cancer, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 84-103, doi: 10.1089/ars.2016.6677.
72. Piechocki, M. P., Yoo, G. H., Dibbley, S. K., Amjad, E. H., and Lonardo, F. (2006) Iressa induces cytostasis and augments Fas-mediated apoptosis in acinic cell adenocarcinoma overexpressing HER2/neu, *Int. J. Cancer*, **119**, 441-454, doi: 10.1002/ijc.21837.
73. Liang, C. H., Shiu, L. Y., Chang, L. C., Sheu, H. M., and Kuo, K. W. (2007) Solama rgine upregulation of Fas, downregulation of HER2, and enhancement of cytotoxicity using epirubicin in NSCLC cells, *Mol. Nutrit. Food Res.*, **51**, 999-1005, doi: 10.1002/mnfr.200700044.
74. Shepard, H. M., Lewis, G. D., Sarup, J. C., Fendly, B. M., Maneval, D., et al. (1991) Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic, *J. Clin. Immunol.*, **11**, 117-127.
75. Zhou, B. P., Hu, M. C.-T., Miller, S. A., Yu, Z., Xia, W., et al. (2000) HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-κB pathway, *J. Biol. Chem.*, **275**, 8027-8031, doi: 10.1074/jbc.275.11.8027.
76. Eustace, A. J., Conlon, N. T., McDermott, M. S., Browne, B. C., O'Leary, P., et al. (2018) Development of acquired resistance to lapatinib may sensitise HER2-positive breast cancer cells to apoptosis induction by obatoclax and TRAIL, *BMC Cancer*, **18**, 965, doi: 10.1186/s12885-018-4852-1.
77. Dubská, L., Anděra, L., and Sheard, M. A. (2005) HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis, *FEBS Lett.*, **579**, 4149-4158, doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.047.
78. Arman, K., Ergün, S., Temiz, E., and Öztuzcu, S. (2014) The interrelationship between HER2 and CASP3/8 with apoptosis in different cancer cell lines, *Mol. Biol. Rep.*, **41**, 8031-8036, doi: 10.1007/s11033-014-3700-x.
79. Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., et al. (2004) Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), *J. Biol. Chem.*, **279**, 5405-5412, doi: 10.1074/jbc.M312044200.
80. Obexer, P., and Ausserlechner, M. J. (2014) X-linked inhibitor of apoptosis protein – a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy, *Front. Oncol.*, **4**, 197, doi: 10.3389/fonc.2014.00197.
81. Strohecker, A. M., Yehiely, F., Chen, F., and Cryns, V. L. (2008) Caspase cleavage of HER-2 releases a Bad-like cell death effector, *J. Biol. Chem.*, **283**, 18269-18282, doi: 10.1074/jbc.M802156200.
82. Marouco, D., Garabadgiu, A. V., Melino, G., and Barlev, N. A. (2013) Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death? *Oncotarget*, **4**, 1556, doi: 10.18632/oncotarget.1436.
83. Zheng, L., Ren, J., Zhang, L., Chen, Q., and Zhu, H. (2004) Overexpression of HER2/neu downregulates wild p53 protein expression via PI3K and Ras/Raf/MEK/ERK pathways in human breast cancer cells, *Chin. J. Pathol.,* **33**, 358-362.
84. Lv, C., Hong, Y., Miao, L., Li, C., Xu, G., et al. (2013) Wentilactone A as a novel potential antitumor agent induces apoptosis and G2/M arrest of human lung carcinoma cells, and is mediated by HRas-GTP accumulation to excessively activate the Ras/Raf/ERK/p53-p21 pathway, *Cell Death Dis.*, **4**, 952-952, doi: 10.1038/cddis.2013.484.
85. Sun, C.-Y., Zhu, Y., Li, X.-F., Wang, X.-Q., Tang, L.-P., et al. (2018) Scutellarin increases cisplatin-induced apoptosis and autophagy to overcome cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via ERK/p53 and c-met/AKT signaling pathways, *Front. Pharmacol.*, **9**, 92, doi: 10.3389/fphar.2018.00092.
86. Singh, P., Ravanan, P., and Talwar, P. (2016) Death associated protein kinase 1 (DAPK1): a regulator of apoptosis and autophagy, *Front. Mol. Neurosci.*, **9**, 46, doi: 10.3389/fnmol.2016.00046.
87. Maik-Rachline, G., Hacohen-Lev-Ran, A., and Seger, R. (2019) Nuclear ERK: Mechanism of translocation, substrates, and role in cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1194.
88. Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D. P., Merlo, A., Hess, D., and Hemmings, B. A. (2004) Stabilization of Mdm2 *via* decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **279**, 35510-35517, doi: 10.3390/ijms20051194.
89. Li, A. G., Piluso, L. G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W. R., and Liu, X. (2006) Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN, *Mol. Cell*, **23**, 575-587.
90. Abraham, A. G., and O'Neill, E. (2014) PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer, *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 798-803, doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.028.
91. Zhang, Y., Yang, H.-Y., Zhang, X.-C., Yang, H., Tsai, M., and Lee, M.-H. (2004) Tumor suppressor ARF inhibits HER-2/neu-mediated oncogenic growth, *Oncogene*, **23**, 7132-7143, doi: 10.1038/sj.onc.1207918.
92. Lee, W.-P., Lan, K.-H., Li, C.-P., Chao, Y., Lin, H.-C., and Lee, S.-D. (2016) Akt phosphorylates myc-associated zinc finger protein (MAZ), releases P-MAZ from the p53 promoter, and activates p53 transcription, *Cancer Lett.*, **375**, 9-19, doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.023.
93. Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., et al. (2016) Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences, *Nature*, **534**, 47-54, doi: 10.1038/nature17676.

94. Nath, S., Ghatak, D., Das, P., and Roychoudhury, S. (2015) Transcriptional control of mitosis: deregulation and cancer, *Front. Endocrinol.*, **6**, 60, doi: 10.3389/fendo.2015.00060.
95. Li, D., and Marchenko, N. D. (2017) ErbB2 inhibition by lapatinib promotes degradation of mutant p53 protein in cancer cells, *Oncotarget*, **8**, 5823, doi: 10.18632/oncotarget.12878.
96. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
97. Derakhshani, A., Rezaei, Z., Safarpour, H., Sabri, M., Mir, A., et al. (2020) Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 3142-3156, doi: 10.1002/jcp.29216.
98. Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., et al. (2012) Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer, *New Eng. J. Med.*, **367**, 1783-1791, doi: 10.1056/NEJMoa1209124.
99. Modi, S., Park, H., Murthy, R. K., Iwata, H., Tamura, K., et al. (2020) Antitumor activity and safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-low-expressing advanced breast cancer: Results from a phase Ib study, *J. Clin. Oncol.*, **38**, 1887-1896, doi: 10.1200/JCO.19.02318.
100. Pernas, S., and Tolaney, S. M. (2019) HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance, *Ther. Adv. Med. Oncol.*, **11**, doi: 10.1177/1758835919833519.

THE INVOLVEMENT OF THE ERBB2/HER2 TYROSINE KINASE RECEPTOR IN THE REGULATION OF CELL DEATH

Review

A. A. Daks[1#], O. A. Fedorova[1#], O. Y. Shuvalov[1], S. E. Parfenyev[1], and N. A. Barlev[1,2*]

[1] *Institute of Cytology, Russian Academy of Science, 194064 Saint Petersburg, Russia*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; E-mail: nick.a.barlev@gmail.com*

Received July 24, 2020
Revised August 10, 2020
Accepted August 12, 2020

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), also known as ERBB2, CD340 or *Neu* protooncogene, is a member of the epidermal growth factor receptor family. Members of the ERBB family, including HER2, activate molecular cascades that stimulate proliferation, migration, and resistance of cancer cells to anticancer therapy. Therefore, these proteins are often overexpressed and/or mutated in various cancer types and are promising targets for anti-cancer therapy. Currently, anti-HER2 drugs have been approved for the treatment of several types of solid tumors. The HER2-specific therapy includes monoclonal antibodies and small molecule inhibitors of tyrosine kinase activity of the receptor such as lapatinib, neratinib, and pyrotinib. In addition to activation of the molecular pathways responsible for cell proliferation and survival under stress conditions, HER2 is also able to regulate programmed cell death at various levels. This review analyzes the published studies focused on the involvement of the HER2 receptor in various signaling pathways and its role in the regulation of apoptosis.

Keywords: HER2, epidermal growth factor receptor, cancer, PI3K-AKT signaling pathway, apoptosis