СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 9, 2020

Эпигенетическая регуляция как основа долговременных изменений в нервной системе: в поисках механизмов специфичности (обзор)
А.А. Бородинова, П.М. Балабан 1139

Рецептор эпидермального фактора роста: ключ для селективной доставки в клетки (обзор)
А.А. Розенкранц, Т.А. Сластникова 1159

История ранних исследований бактериофагов и рождение основных концепций вирусологии (обзор)
А.В. Летаров 1189

Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина (обзор)
А.Б. Матиив, Н.П. Трубицина, А.Г. Матвеенко, Ю.А. Барбитов, Г.А. Журавлева, С.А. Бондарев 1213

Репрограммирование клеток с сохранением эпигенетического возраста: преимущество или ограничение? (обзор)
Е.М. Самойлова, В.П. Баклаушев 1240

Липоксигеназы бактерий и простейших могут участвовать в межклеточной сигнализации и подавлении иммунного ответа
Г.Ф. Куракин, А.М. Самоукина, Н.А. Потапова 1256

Различные роли изоформ актина в процессе деления эпителиальных клеток
Г.С. Шагиева, И.Б. Алиева, К. Шапонье, В.Б. Дугина 1274

Tn антиген в составе молекулы CD44 как новый биомаркер опухолевых клеток с аберрантным гликозилированием
М.Л. Шувалова, А.Т. Копылов, Д.В. Мазуров, А.В. Пичугин, Н.В. Бовин, А.В. Филатов 1285

Ультраструктура гепатоцитов лабораторных мышей при содержании животных на стандартной сухой лабораторной диете
В.Б. Вайс, И.М. Вангели, О.А. Аверина, М.Л. Ловать, Л.Е. Бакеева 1294

Цистеиновая протеаза из семян льна обладает сильным антикоагулянтным, антитромбоцитарным действием и способна растворять тромбы
Ш.К.М. Нандиш, Дж. Кенгайя, Чх. Рамачандрайя, Чандрамма, А. Шиваия, С.М. Сантош, Тирунавуккарасу, Д. Саннанингая 1305

CONTENTS

Vol. 85, Publ. 9, 2020

Epigenetic Regulation as a Basis of Long-Term Changes in the Nervous System: in Search of Specificity Mechanisms (Review)
A. A. Borodinova and P. M. Balaban 1139

Epidermal Growth Factor Receptor: Key to Selective Intracellular Delivery (Review)
A. A. Rosenkranz and T. A. Slastnikova 1159

History of Early Bacteriophage Research and Emergence of the Key Concepts in Virology (Review)
A. V. Letarov 1189

Amyloid and Amyloid-Like Aggregates: Diversity and Term Crisis (Review)
A. B. Matiiv, N. P. Trubitsina, A. G. Matveenko, Y. A. Barbitoff, G. A. Zhouravleva, and S. A. Bondarev 1213

Cell Reprogramming with Conservation of Epigenetic Age: Advantage or Limitation? (Review)
E. M. Samoilova and V. P. Baklaushev 1240

Lipoxygenases of Bacteria and Protozoa May Contribute to Cell-to-Cell Signaling and Immune Response Suppression
G. F. Kurakin, A. M. Samoukina, and N. A. Potapova 1256

Divergent Impact of Actin Isoforms on Cell Division of Epithelial Cells
G. S. Shagieva, I. B. Alieva, C. Chaponnier, and V. B. Dugina 1274

CD44-Associated Tn Antigen as a New Biomarker of Tumor Cells with Aberrent Glycosilation
M. L. Shuvalova, A. T. Kopylov, D. V. Mazurov, A. V. Pichugin, N. V. Bovin, and A. V. Filatov 1285

Ultrastructure of Hepatocytes in Laboratory Mice when Keeping Animals on a Standard Dry Laboratory Diet
V. B. Vays, I. M. Vangeli, O. A. Averina, M. L. Lovat, and L. E. Bakeyeva 1294

Flaxseed Cysteine Protease Exhibits Strong Anticoagulant, Antiplatelet, and Clot-Dissolving Properties
S. K. M. Nandish, J. Kengaiah, Ch. Ramachandraiah, Chandramma, A. Shivaiah, S. M. Santhosh, Thirunavukkarasu, and D. Sannaningaiah 1305

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1139 – 1158

УДК 612.822;577.1

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КАК ОСНОВА ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ: В ПОИСКАХ МЕХАНИЗМОВ СПЕЦИФИЧНОСТИ*

Обзор

© 2020 А.А. Бородинова, П.М. Балабан**

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия; электронная почта: borodinova.msu@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2020
После доработки 16.07.2020
Принята к публикации 29.07.2020

Долговременные адаптивные изменения функционирования нервной системы (пластичность, память) прямо связаны с изменением уровней экспрессии многих генов, но не отражаются в структуре ДНК, то есть являются проявлением эпигенетической регуляции. Суммируя известные данные о роли эпигенетических процессов и путей регуляции и хранения изменений в нервной системе, можно выделить несколько ключевых моментов. (1) Разнообразные факторы, управляющие структурной перестройкой хроматина и ДНК-метилтрансферазы в составе сложных мультибелковых репрессорных комплексов, координированно и кооперативно функционируют в качестве «молекулярных тормозов» («molecular brake pad»), избирательно сохраняя низкий уровень экспрессии только некоторых генов в условиях покоя. (2) В ответ на значимые физиологические стимулы в активированных нейронах запускается каскад биохимических событий, сопряженных с транспортом различных активаторных молекул (протеинкиназы, NO-содержащие комплексы) в ядро. (3) Стимул-специфичное нитрозилирование и фосфорилирование отдельных эпигенетических факторов сопряжено со снижением их ферментативной активности или изменением внутриклеточной локализации, что выражается во временной дестабилизации репрессорных комплексов. (4) Снятие «молекулярных тормозов» открывает «критическое окно» для глобальных и локальных эпигенетических перестроек, запуска специфических транскрипционных программ и модуляции эффективности синаптических связей. Можно считать, что обратимые посттрансляционные модификации гистонов служат основой для пластических изменений в функциональных сетях нейронов. С другой стороны, метилирование ДНК и метил-зависимые способы трехмерной организации хроматина могут служить стабильной молекулярной основой для долговременного хранения пластических изменений и памяти.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: память, обучение, эпигенетика, экспрессия генов, гистондеацетилаза, метилирование ДНК, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0320972520090018

ВВЕДЕНИЕ

Исследованию механизмов памяти посвящено огромное количество работ, однако до сих пор нет единого мнения о молекулярных механизмах формирования и долговременного хранения памятного следа, а также эффективных способов изменения памяти, коррекции патологий памяти. За последние годы накопилось много данных о том, что долговременные изменения в нервной системе, в том числе и память, ассоциированы с изменением экспрессии определенных групп генов [1, 2]. Одной из существенных проблем является понимание того, как решается вопрос специфического контроля отдельных групп генов в определенные моменты времени в определенных функциональных сетях нейронов при обучении и какие механизмы стоят за поддержанием этих изменений. Поскольку долговременная память является приобретенным свойством любого организма и не отражается в структуре генома, но является следствием длительного изменения уровней экспрессии определенных генов, она по определению является эпигенетически регулируемым феноменом [2, 3]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было по-

Принятые сокращения: HDAC – гистондеацетилаза; HAT – гистонацетилтрансфераза; DNMT – ДНК-метилтрансфераза; PK – протеинкиназа; PP – протеинфосфатаза; H3K(n) – n-й лизин третьего гистона; NO – оксид азота.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 9, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

казано, что механизмы пластичности и памяти тесно сопряжены с эпигенетическими перестройками, контролирующими доступность определенных участков генов для различных регуляторных молекул [4–6]. В рамках данного обзора мы попытаемся разобраться в некоторых составляющих специфического контроля экспрессии генов на молекулярном и клеточном уровне и обсудим роль эпигенетики в этих процессах.

ПОВЕДЕНИЕ И ЭПИГЕНЕТИКА: ЕСТЬ ЛИ СПЕЦИФИКА?

Анализируя зависимость изменений поведения (в том числе и долговременные изменения – память) от любых молекулярных процессов, чрезвычайно важно понять, насколько специфична взаимосвязь исследуемых явлений. Нет никаких сомнений в том, что изменения практически в любых молекулярных или нейрохимических процессах отразятся в активности нейронов и в поведении, поэтому стандартный подход с избирательной блокадой какой-либо молекулярной системы и анализом изменений поведения говорит лишь о том, что данная система активна в мозге.

Необходимость синтеза нового белка (трансляции) и синтеза РНК для долговременных изменений поведения (формирования памяти) показана сравнительно давно на брюхоногом моллюске *Aplysia* [7]. На этом же моллюске впервые было продемонстрировано, что известный стимулятор пластических процессов, серотонин, индуцирует сборку активаторных комплексов транскрипционного фактора CREB1 с гистонацетилтрансферазой CBP и вызывает ацетилирование гистонов в промоторе гена пластичности *C/EBP*, которое коррелирует с уровнем его экспрессии [8]. С другой стороны, конкурирующий с серотонином тормозный медиатор нейропептидной природы FMRFa облегчает связывание транскрипционного фактора CREB2 с промотором гена и стимулирует деацетилирование гистонов за счет привлечения гистондеацетилаз HDAC5. В электрофизиологических экспериментах на идентифицированных сенсорных нейронах было экспериментально показано, что серотонин вызывает усиление синаптических ответов, а FMRFa – депрессию этих же ответов. Учитывая известную роль этих нейронов в поведении, можно считать эту работу одной из первых, в которых показана роль посттрансляционных модификаций гистонов в регуляции синаптической пластичности, отражающейся на поведении животного [8].

В литературе последних лет накопилось много данных о балансе гистонацетилтрансфераз (HAT) и гистондеацетилаз (HDAC), изменения которого нарушают/улучшают пластичность, память и процессы обучения у взрослых животных [5]. Нарушение этого баланса не только изменяет эффективность обучения, но и является коррелятом многих нейропатологий. Применение ингибиторов, меняющих эпигенетический баланс, может быть основой терапии патологий [9]. Широкое распространение получило ингибирование HDAC с целью изменения когнитивных способностей животных, в том числе долговременной памяти [5, 9]. Положительное влияние ингибиторов HDAC на формирование и восстановление синаптической пластичности и памяти было показано не только на млекопитающих, но и на дрозофилах [10] и цыплятах [11]. На моллюсках была продемонстрирована возможность улучшения обстановочной памяти и восстановления нарушенной памяти введением ингибитора HDAC – бутирата натрия. Существенным в этом исследовании является демонстрация того, что ингибитор HDAC не изменяет величину поведенческой реакции в обычных условиях, но избирательно действует на величину реакции у этого же животного только в условиях (обстановке) обучения, то есть усиливает память, не меняя поведения в нормальных условиях [12]. В сравнительном исследовании роли гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 у мышей было показано, что усиление экспрессии HDAC2, но не HDAC1 приводит к уменьшению плотности синапсов, ухудшению синаптической пластичности и формирования памяти, причем эти явления можно было снять применением ингибиторов HDAC [13]. Заметим, что большинство ингибиторов HDAC не являются специфичными, и в этом смысле получаемые результаты неоднозначны, учитывая разную роль HDAC1 и HDAC2. В этом плане интересна работа Morris et al., в которой использовали нокаутных мышей и отдельно оценивали роль HDAC1 и HDAC2 [14]. В этой работе показано, что у нокаутных по HDAC2 мышей ускорено угасание условной оборонительной памяти и условной аверзии к пище, причем задачи на внимание эти животные выполняли лучше контрольных. У этих мышей не было отмечено ухудшения моторного обучения и эпизодической памяти, что прямо указывает на специфичность участия HDAC2 в разных поведенческих задачах. Авторы делают вывод о том, что торможение активности HDAC2 улучшает ассоциативные процессы, не влияя на неассоциативные [14].

Существенно отметить, что изменения плотности упаковки хроматина большей частью об-

ратимы и только «снимают тормоза», открывая возможность для долговременных изменений экспрессии генов [2]. С другой стороны, длительное хранение информации в нервных клетках может быть связано с другими эпигенетическими процессами, протекающими на уровне ДНК. В пионерских работах 70–80-х годов прошлого века были продемонстрированы интересные данные, отмечающие сопряженность пластических процессов в нервной системе и метилирования ДНК. В работах Ванюшина и соавт. было описано изменение метилирования ДНК в функционально активных областях мозга крыс, которое авторы рассматривали в качестве одного из механизмов запуска транскрипции генов при обучении [15, 16]. Уже в 1976 году разделение фракций ядер нейронов и глиальных клеток с помощью ультрацентрифугирования позволило определить, что «при выработке условного рефлекса физиологические процессы в первую очередь отражаются на геноме более лабильных, быстро реагирующих клеток-нейронов и, возможно, сопряжены с вовлечением в работу неких специфических участков ДНК» [16]. Позднее Holliday [17] было высказано предположение о том, что одним из механизмов долговременного хранения памяти в нейроне является метилирование ДНК. Было предположено, что нейроны нервной сети (энграммы) конкретного вида памяти в ответ на специфические стимулы могут изменить состояние метилирования некоторых сайтов ДНК, и это состояние будет храниться долго, так как, по некоторым данным, в случае повреждения ДНК бывшие метилированными восстановленные цитозины опять подвергаются метилированию, поддерживая общий паттерн метилирования ДНК [18]. Учитывая количество сайтов метилирования и количество нейронов, информационная емкость такого хранения памяти очень высока. Holliday рассматривал также и модификации гистонов как возможный эпигенетический механизм, но считал, что из-за отсутствия ковалентных связей гистонов с ДНК стабильность этих изменений будет существенно меньше, чем метилирование цитозина в ДНК. Позднее эти предсказания получили экспериментальные подтверждения в многочисленных работах на млекопитающих и беспозвоночных [3, 18–20]. Учитывая, что метилирование ДНК обычно связано с уменьшением активности гена, наличие гиперметилирования после обучения должно свидетельствовать о постоянном подавлении активности определенных групп генов. Эта идея получила подтверждение в исследованиях на млекопитающих и моллюсках [19, 21].

В одной из работ удалось провести детальный полногеномный анализ хроматина и проанализировать профиль экспрессии генов для двух ключевых для обстановочной оборонительной памяти областей мозга (зона CA1 гиппокампа и передняя поясная извилина неокортекса), разных клеточных типов (нейроны, глия) и трех временных точек до и после формирования обстановочной памяти у мышей [3]. Авторам удалось обнаружить, что паттерн изменений метилирования ДНК хорошо коррелирует с известными данными о пространственной локализации памяти, были отмечены стабильные и динамические изменения в нейронах. Заметим, что метилирование гистонов наблюдалось и в нейронах, и в глиальных клетках и было скорее глобальным с небольшим количеством локальных изменений.

Считается, что посттрансляционные изменения хроматина в основном связаны с фазой консолидации памяти [22, 23], что проявилось и в том, что метилирование гистонов не коррелировало с дифференциальной экспрессией генов во время хранения памяти [3]. Изменения метилирования ДНК в этой работе наблюдали как в фазу консолидации, так и в период хранения памяти. В литературе рассматривается также и роль метилирования ДНК в качестве механизма стабилизации активности нервной сети (энграммы) во время консолидации, что служит основой для успешного воспроизведения/хранения памяти [24].

Таким образом, можно предположить, что обратимые посттрансляционные модификации гистонов служат основой для пластических изменений в функциональных сетях нейронов [2]. С другой стороны, метилирование ДНК изменяет экспрессию генов на длительный срок (пожизненно), и поскольку нейроны взрослых животных не делятся, может служить стабильной молекулярной основой для хранения пластических изменений и памяти.

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННЫЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СЕТЯХ НЕЙРОНОВ

Формирование и поддержание следа памяти зависит от координированной и тонко-настраиваемой работы различных групп эпигенетических регуляторов в определенных отделах мозга и при разных парадигмах обучения. Стимул-зависимые изменения эпигенетического ландшафта в специфических функциональных сетях нейронов или регионах мозга, по сути, отражают характер и продолжительность регуляции транскрипционных процессов, иными словами, «критическое окно» для пластических изменений.

Регион-специфичные эпигенетические перестройки. На сегодняшний день подавляющее число сведений о динамике эпигенетических изменений (посттрансляционные модификации гистонов, метилирование ДНК) при обучении или извлечении памяти получено в ходе анализа различных областей мозга (подкорковые структуры и участки коры) [3, 20, 22, 25–28]. Показано, что эпигенетические изменения в регуляторных областях отдельных генов пластичности коррелируют с уровнем их экспрессии [3, 20, 22, 25–28]. Гетерогенность анализируемых образцов может осложнить интерпретацию данных. Согласно современным представлениям, след памяти может быть «закодирован» в специфических функциональных сетях (энграммах) определенных областей мозга в процессе обучения, поэтому вполне логичным и интересным продолжением этого направления будет изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе энграмм-специфичной консолидации и реконсолидации (повторной консолидации при реактивации) памяти.

Как оказалось, регион-специфичные перестройки хроматина и метилирование ДНК коррелируют с вовлеченностью соответствующих структур мозга или даже определенных энграмм в формирование и поддержание недавней и отставленной памяти [3, 25]. Первоначальная консолидация памяти в сети нейронов гиппокампа (недавняя память, recent memory; часы–дни) [29] сопровождается быстрым, но обратимым увеличением представленности некоторых посттрансляционных модификаций гистонов (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование) и гидроксиметилирования ДНК [23, 25, 28]. Впоследствии происходит постепенное снижение вклада сетей гиппокампа в воспроизведение памяти по мере увеличения роли сетей коры [29]. Функциональные сети участков коры, связанные с длительным хранением и воспроизведением памяти (отставленная память, remote memory; дни–недели), устанавливаются сразу при обучении, но вклад этих энграмм в воспроизведение памяти нарастает со временем по мере их «созревания» (морфологического и функционального) [23, 29]. Немногочисленные исследования временных характеристик эпигенетических перестроек в корковых отделах содержат противоречивые данные, не позволяющие сделать однозначного вывода. По некоторым данным, эпигенетические перестройки хроматина в префронтальной коре появляются с задержкой (24 часа), но сохраняются в неизменном виде по меньшей мере в течение недели [25]. Согласно другой работе, в орбитофронтальной коре эпигенетические изменения носят обратимый характер [23].

Было показано, что во время обучения между клетками подкорковых структур (гиппокамп, миндалина) и кортикальными нейронами определенным образом изменяются функциональные связи, объединяющие затронутые нейроны в энграмму [29]. Входы от гиппокампа, энторинальной коры и миндалины обеспечивают определенный уровень сетевой активности, который влияет на установление и «созревание» активности нейросети в корковых отделах [23, 29]. Направленное подавление активности любого из этих входов (химически или оптогенетически) при обучении приводит к последующим нарушениям длительного хранения памяти (remote memory).

По нашим предположениям, сигналы, приходящие из подкорковых структур, способны запускать в кортикальных нейронах эпигенетические изменения, которые могут быть частью процесса «созревания памяти» в сетях неокортекса. В качестве подтверждения этого предположения интересно рассмотреть работу, в которой с помощью протокола высокочастотной стимуляции индуцировали долговременные пластические изменения в медиальной префронтальной коре крыс *in vivo* и наблюдали отставленное и продолжительное (часы) увеличение активности ключевых эпигенетических регуляторов (HAT, DNMT), приводящее к тотальным перестройкам хроматина [27]. Выборочная проверка выявила эпигенетические изменения в промоторных областях некоторых генов пластичности (*Bdnf*, *Reln*), сопряженные с увеличением их транскрипции и трансляции. Продукты этих генов могут участвовать в изменении структурных характеристик и эффективности связей между нейронами [30, 31]. В другой работе быстрое, но обратимое увеличение ацетилирования гистонов наблюдали в орбитофронтальной коре животных после обучения [23]. С течением времени у этих животных было отмечено увеличение количества синаптических шипиков. Оказалось, что инъекции ингибиторов гистондеацетилаз на ранней стадии после обучения не только продлевают ацетилированное состояние гистонов, но стимулируют образование шипиков и улучшают отставленную память животных, чего не наблюдается при более позднем введении веществ [23]. При исследовании молекулярных механизмов, стоящих за увеличением ацетилирования гистонов в орбитофронтальной коре в ответ на обучение, была обнаружена связь с активацией MAPK/ERK1/MSK1 сигнального каскада. Блокирование активности этих киназ сопровождается исчезновением эпигенетических и морфологических перестроек в коре и нарушением отставленной памяти [23].

Сопряженность эпигенетических перестроек в разных регионах мозга. При исследовании регуляции эффективности обучения и памяти активно применяется стратегия направленного изменения ацетилирования или метилирования гистонов и метилирования ДНК в различных регионах мозга [4, 6]. Из отдельных работ следует довольно интересный вывод: направленное изменение эпигенетического ландшафта в одной структуре мозга может коррелировать с перестройками хроматина и изменением экспрессии генов в другой структуре и отражается на эффективности связей между регионами мозга/элементами энграммы [26, 32]. В частности, изменение эпигенетического профиля в энторинальной коре обученных животных (снижение репрессорных меток H3K9me2, рост активных меток H3K9ac, H3K4me3), вызванное локальным введением ингибитора гистонметилтрансфераз G9a/GLP, сопровождается неожиданным увеличением представленности репрессорных меток H3K9me2 в зоне CA1 гиппокампа [26]. Эпигенетические манипуляции в энторинальной коре – одной из главных узловых точек для обмена информацией между гиппокампом/корой и миндалиной/корой – затрагивают промоторные области некоторых генов пластичности (*DNMT3a*, *Egr1*, *Bdnf*) и приводят к улучшению контекстной (гиппокамп-зависимой) и ключевой (миндалина-зависимой) памяти, возможно, за счет изменения эффективности связей энторинальной коры с другими структурами [26]. Наоборот, ингибирование G9a/GLP в гиппокампе животных при обучении сопровождается ростом числа активных меток H3K4me3 в энторинальной коре [26]. По данным литературы, изменение активности миндалины тоже сопряжено с модуляцией молекулярных каскадов в структурах, связанных с ней функционально. В частности, введение ингибитора HDAC в базолатеральное ядро миндалины сопровождается увеличением количества белка BDNF в дорзальном гиппокампе обученных животных [32]. Приведенные данные свидетельствуют, что динамические эпигенетические перестройки хроматина в одних структурах мозга могут влиять на молекулярные характеристики в других структурах, возможно, за счет изменения активности этих структур и характера взаимодействия между ними.

Таким образом, изменение эпигенетического ландшафта на ранних стадиях после обучения, по-видимому, критически необходимо для «перенастройки» сети для длительного хранения следа памяти, а искусственно вызванные эпигенетические перестройки хроматина способствуют еще более эффективной функциональной «перестройке» гиппокамп-кортикальных и кортико-кортикальных связей.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ПЛАСТИЧНОСТИ

Своевременное и выверенное изменение экспрессии генов, в том числе изменение транскрипции генов синаптической пластичности (plasticity transcriptome), в ответ на изменения в синаптической активности нейронов основано на сложном взаимодействии между эпигенетическими модификациями гистонов, вовлечении регуляторных белков, изменении уровня метилирования ДНК. В мозге взрослых животных ландшафт экспрессии генов подвержен изменениям в зависимости от активности нейронов и поведенческого опыта (отражающего нейронную активность). Эти изменения критичны для адаптивных изменений поведения, включая асоциативную долговременную память [20, 33, 34]. Изменения синаптической эффективности и уровня возбудимости мембраны клетки влияют на характер связей между нейронами, регулируют общий уровень активности нервной сети и являются триггером модуляции транскрипции определенных групп генов, экспрессия которых зависит от клеточной активности. В литературе различают гены раннего и позднего ответа [35, 36]. Эти наборы генов различаются по необходимости синтеза новых белков и скорости индукции изменений экспрессии. Недавно было экспериментально показано, что разные паттерны клеточной активности индуцируют отличающиеся программы экспрессии генов. В зависимости от длительности стимула наблюдается градуальное увеличение вовлеченности генов, принадлежащих к группам генов раннего (первичного) и позднего (вторичного) ответа [37]. Непродолжительная стимуляция кортикальных нейронов в культуре или нейронов зрительной коры *in vivo* достаточна для активации экспрессии небольшой группы генов раннего ответа с очень быстрой кинетикой (немедленные ранние гены). Существенно, что первая волна транскрипции не зависит от *de novo* синтеза белков. Некоторые из этих генов первой волны активируются в ответ на широкий набор внешних стимулов и, по всей видимости, являются необходимым и универсальным, но неспецифичным звеном клеточного ответа. Авторы показали, что при увеличении длительности стимуляции за первой волной транскрипции следуют вторая и третья волны транскрипции, затрагивающие гены раннего ответа с медленной кинетикой и гены позднего ответа соответственно [37]. Гены

позднего ответа изменяют экспрессию с большой задержкой, для изменений им необходим синтез новых белков, их экспрессия регулируется белковыми продуктами генов раннего ответа [35, 36].

В очень интересной работе на культуре кортикальных нейронов мыши анализировалась стабильность спонтанной активности нейронов [38]. Проверялось предположение о том, что для поддержания постоянного уровня активности (гомеостаза активности нейрона) необходимо участие активность-зависимой транскрипции, однако гомеостаз наблюдался и в нейронах с подавленной активностью гена пластичности *Arc*, отсутствием активность-зависимых транскрипционных факторов AP1 and SRF. Авторы делают вывод о том, что активность-регулируемая транскрипция не является необходимой для постоянно поддерживаемой активности нейрона [38].

Интересная гипотеза о связи между синаптическими и эпигенетическими механизмами хранения памяти высказана в работе Kyrke-Smith и Williams [2]. Опираясь на идею о том, что изменения синаптической эффективности при обучении образуют поддерживаемые на сетевом уровне долговременные изменения работы нервной сети (энграмма памяти), авторы предложили путь создания и хранения энграмм памяти. Суть гипотезы заключается в том, что предлагается выделить «транскриптом пластичности» (plasticity transcriptome), который лежит в основе структурных и функциональных модификаций синаптических связей в сети во время обучения и несколько часов после обучения (время консолидации памяти). В это время максимально активны гены, продукты которых связаны с пластичностью (CREB, Egr1, AP1, Arc, BDNF), и этот период заканчивается активацией репрессоров активности генов (гистондеацетилаз), переходя к работе «транскриптома хранения памяти» [2]. По сути, авторы выделяют специфическую для формирования и хранения памяти роль ацетилирования гистонов в отдельный механизм метапластичности, регулирующий хранение энграммы памяти. Очень важным для нашего анализа является выделение «Разрешающего (пластичность) эпигенетического состояния» (Permissive epigenetic state), которое совпадает с периодом индукции долговременных изменений функционирования нервных сетей (консолидация, реконсолидация). Можно сказать, что это эпигенетическое «состояние» открывает окно возможностей для долговременных изменений. Специфичность эпигенетической регуляции авторами гипотезы имплицитно подразумевается специфичным набором генов, изменяющих уровень экспрессии во время индукции пластичности, во время формирования долговременных изменений и не подверженных изменениям во время хранения памяти. Существенным и интересным в этой работе является четкая формулировка роли эпигенетической регуляции в процессе формирования и хранения памяти – возможность изменений в норме блокирована эпигенетически, а снятие эпигенетического «тормоза» открывает на некоторое время возможность пластических изменений экспрессии генов, тогда как при хранении уже сформированной памяти возможность долговременных изменений опять заблокирована.

Рассматривая механизмы хранения и регуляции памяти в нервной сети, мы неизбежно приходим к противопоставлению изменений в отдельном синапсе и в ядре нейрона. В последнем случае изменения коснутся всех синапсов данного нейрона. Эпигенетические механизмы регуляции формирования и хранения памяти скорее относятся ко второму способу, так как изменения уровня экспрессии любого гена в случае синтеза белкового продукта гена в теле клетки должны одинаково отразиться во всех синапсах данной клетки. Известны и уникальные исключения из этого правила, когда в синапс идет мРНК и трансляция происходит прямо в синапсе. Это установлено для двух важнейших генов, участие продуктов которых в формировании (Arc) и хранении (PKMζ) памяти многократно показаны [39, 40].

По всей видимости, базовые принципы формирования и хранения памяти должны быть довольно консервативными, поскольку одни и те же регуляторные молекулы присутствуют в ряду от улиток и дрозофил до человека. Ввиду высокой консервативности гистоновых белков в ряду организмов от самых простейших беспозвоночных до человека, эпигенетические модификации хроматина могут осуществляться по общим законам у отдаленных групп организмов, из-за чего их можно рассматривать как уникальный высокоэффективный способ долговременной регуляции работы нервных клеток и основу для кодирования памяти.

ГИПОТЕЗА «МОЛЕКУЛЯРНЫХ ТОРМОЗОВ» И СПОСОБЫ СТИМУЛ-СПЕЦИФИЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ

Почти 10 лет назад была высказана гипотеза, согласно которой в качестве «молекулярных тормозов» (molecular brake pad) экспрессии специфических генов рассматривают комплексы HDAC с различными ко-репрессорами (см. далее) [41]. Временное снятие этих «молекуляр-

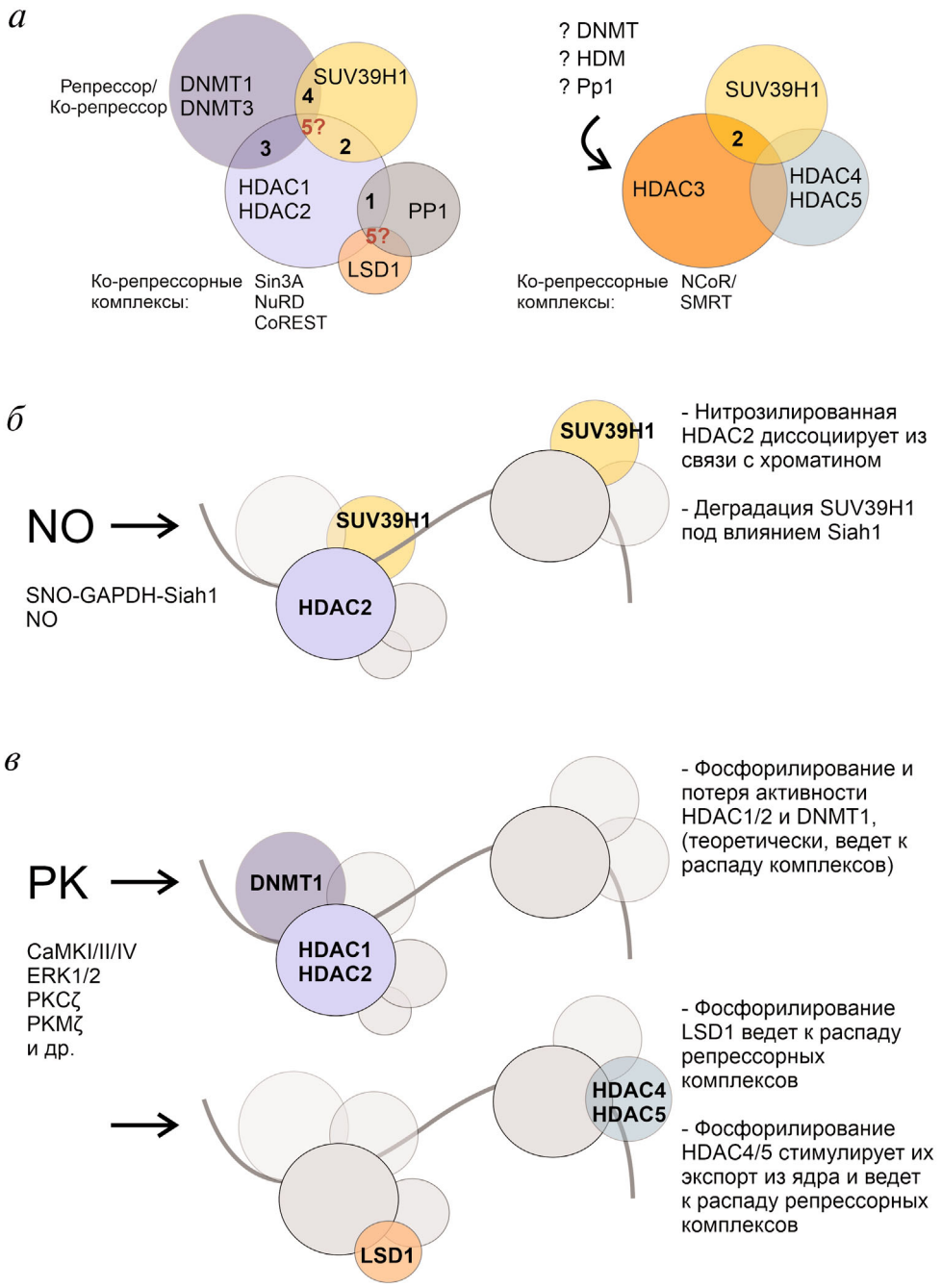
ных тормозов» для активации экспрессии генов может происходить только в ответ на достаточно сильные физиологические стимулы [41]. Данный обзор не ставит целью описание всех возможных биохимических механизмов, необходимых для временного снятия «молекулярных тормозов» в функциональных сетях нейронов при физиологических нагрузках, однако далее мы остановимся на некоторых наиболее значимых и специфичных, по нашему мнению.

Устройство репрессорных комплексов. Ассоциированные с хроматином репрессорные комплексы представляют собой сложно устроенные мультибелковые кластеры, центральной частью которых, по всей видимости, являются гистондеацетилазы класса I (HDAC I) [42]. В литературе описаны взаимодействия между HDAC I и другими гистондеацетилазами (класс HDAC II), некоторыми гистонметилтрансферазами (SUV39H1), гистондеметилазами (JMJD2A и LSD1), ДНК-метилтрансферазами (DNMT3a, DNMT3b, DNMT1) и фосфатазами (PP1) (рис. 1, *а*) [42–52]. Находящиеся в комплексах эпигенетические агенты могут работать кооперативно. Результатом координированной работы различных комбинаций эпигенетических агентов будут комплексные сайт-специфичные эпигенетические перестройки (рис. 1, *а*), создающие «молекулярные тормоза» для отдельных генов-мишеней [6, 46, 49]. Потенциально, взаимодействие разного набора эпигенетических агентов с молекулами, распознающими специфические сайты на хроматине, открывает возможности для более тонкой и эффективной регуляции транскрипции специфических генов-мишеней.

Гистондеацетилазы класса I (HDAC I). Из литературы хорошо известно, что представители HDAC I (HDAC1, 2, 3) являются важным элементом механизмов пластичности и памяти [13, 41]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было наглядно продемонстрировано, что в покое HDAC в составе репрессорных комплексов связаны с промоторными областями некоторых генов и подавляют их транскрипцию [13, 53–55]. Однако первый же вопрос, с которым сталкиваются исследователи, заключается в том, каким образом достигается специфическая эпигенетическая регуляция отдельных генов пластичности при отсутствии субстратной специфичности гистондеацетилаз. Исчерпывающего ответа на этот вопрос нет. Основная информация о характеристиках HDAC была получена в ходе работы с не-нейрональными клеточными линиями. На основании имеющихся литературных данных, HDAC не связываются с последовательностью ДНК напрямую, но являются центральной, каталитически активной частью различных репрессорных комплексов (Sin3A, NuRD, CoREST для HDAC1/HDAC2, и NCoR/SMRT для HDAC3) (рис. 1, *а*), которые, по всей видимости, направляют гистондеацетилазы в определенные локусы/участки хроматина для осуществления контроля транскрипции специфических генов [13, 41, 42, 45, 55, 56].

С помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChIP) в образцах мозга мышей было проанализировано распределение HDAC1 и HDAC2 в промоторных областях ряда генов, часть которых не связана с синаптической пластичностью (*Atf4*, *Pgk1*, *Gapdh* и др.), а белковые продукты других считаются специфическими регуляторами морфологии (NrxnI, Shank3, Synapsin2, PSD95 и др.), синаптической пластичности (GluR1/2, CamKIIa, Creb, Cbp, PKMζ и др.) или регулируются клеточной активностью (BDNF, Egr-1, c-Fos, Arc и др.) [13]. Оказалось, что в норме HDAC2 с высокой избирательностью (в сравнении с HDAC1) связываются с промоторными областями большинства перечисленных специфических генов [13]. Анализ ядерных экстрактов на предмет взаимодействия HDAC1/2 с репрессорными комплексами Sin3A, NuRD и CoREST показал, что только HDAC2 связывается с комплексом ремоделинга хроматина CoREST. По всей видимости, взаимодействие HDAC2 в составе репрессорных комплексов CoREST с промоторными участками некоторых генов пластичности сдерживает их экспрессию в покое. При нарушении продукции HDAC2 у нокаутных животных наблюдается селективное увеличение уровня ацетилирования гистонов в промоторных областях некоторых генов пластичности, которое не может быть скомпенсировано нативной HDAC1. Необходимо отметить, что описанный механизм едва ли является единственным, и HDAC в составе других корепрессорных комплексов могут принимать участие в тонкой модуляции работы отдельных генов пластичности. Будучи частью NCoR/SMRT репрессорного комплекса, HDAC3 специфически связывается регуляторными областями некоторых генов пластичности (*Bdnf*, *Npas4*, но не *Fos*), при этом в целом по геному большая часть сайтов связывания HDAC3 приходится на межгенные и внутригенные участки [55].

По некоторым данным, взаимодействие представителей HDAC I с другими эпигенетическими агентами (см. далее), в частности с гистонметилтрансферазой SUV39H1, обеспечивает доставку репрессорных комплексов в участки хроматина для подавления транскрипции отдельных генов [46]. Это объясняет наблюдения о том, что процессы деацетилирования и метилирования гистонов зачастую сопряжены [6].



Организация репрессорных комплексов и способы регуляции их связи с хроматином (по данным, представленным в обзоре). *а* – Схематичное изображение возможных комбинаций репрессорных (HDAC, DNMT) и ко-репрессорных белков разных классов в составе мультибелковых репрессорных комплексов. Возможность белок-белкового взаимодействия между представителями гистондеацетилаз (HDAC), ДНК-метилтрансфераз (DNMT), протеинфосфатаз (PP), гистондеметилаз (HDM, LSD1) и гистонметилтрансфераз (SUV39H1) изображена в виде пересекающихся сфер. Цифрами обозначены возможные комбинации эпигенетических перестроек как результат координированной работы репрессорных белков (по данным литературы: 1 – деацетилирование и дефосфорилирование гистонов; 2 – деацетилирование и метилирование гистонов; 3 – деацетилирование гистонов и метилирование ДНК; 4 – метилирование гистонов и ДНК; 5 – возможные более сложные комбинации). *б* и *в* – Регуляция функций компонентов репрессорных комплексов посредством оксида азота (NO) или протеинкиназ (PK). Активация нейронов в результате пластических изменений сопровождается перемещением PK и новосинтезированных молекул NO в ядро, в результате чего компоненты репрессорных комплексов подвергаются соответствующим модификациям (фосфорилирование, нитрозилирование), которые влияют на их стабильность, активность или внутриклеточную локализацию. Временная дестабилизация и диссоциация мультибелковых репрессорных комплексов из связи с хроматином открывает «окно возможностей» для изменения эпигенетического профиля и активации определенных групп генов пластичности. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

Гистондеацетилазы класса IIa (HDAC IIa). При рассмотрении механизмов пластичности, эффективности обучения и хранения памяти отдельный интерес представляют некоторые представители гистондеацетилаз класса HDAC IIa (HDAC4, HDAC5), которые участвуют в регуляции транскрипционных программ, связанных со структурными изменениями синапсов и эффективностью синаптических связей [57–59].

Особенностью представителей HDAC IIa является способность перемещаться между цитоплазмой и ядром в зависимости от степени их фосфорилирования, что неизбежно отражается на возможности HDAC IIa взаимодействовать с компонентами репрессорных комплексов и обеспечивает дополнительный уровень пространственно-временного контроля экспрессии генов (см. далее) [51]. В спонтанно активных культурах нейронов гистондеацетилазы HDAC IIa распределены между цитоплазматическим (HDAC4) и ядерным компартментами (HDAC5) [60, 61]. Физиологическая стимуляция нейронов и увеличение концентрации внутриклеточного кальция являются факторами, стимулирующими фосфорилирование HDAC IIa (см. далее) и их экспорт из ядра в цитоплазму [60]. Подавление нейрональной активности или применение специфических кальций-связывающих агентов, наоборот, стимулирует перемещение HDAC IIa в ядро [58, 60, 61]. Было продемонстрировано, что смещение равновесия в сторону избыточного содержания HDAC IIa в ядре (при оверэкспрессии устойчивой к фосфорилированию мутантной изоформы) сопровождается стимул-зависимым подавлением транскрипции целого ряда генов пластичности (*Homer1*, *Arc*, *Npas4*, *Nr4a1*, *Egr2* и т.д.) [59, 61].

По некоторым данным, ядерно-цитоплазматические транслокации HDAC4/5 могут играть существенную роль при формировании энграмм и кодировании памяти (memory encoding) [59]. В норме размер энграммы фиксирован и процесс вовлечения (allocation) клеток в ограниченную функциональную сеть сопровождается определенным отбором нейронов по меньшей мере на основании характеристик их возбудимости на момент обучения [62]. Возможно, уровень возбудимости нейронов влияет на распределение HDAC4/5 между ядром и цитоплазмой и определяет, какие клетки более эффективно будут вовлекаться в функциональную сеть. Это предположение находит подтверждение в работе Zhu et al. [59], где с помощью иммуногистохимического анализа было исследовано распределение HDAC4 в ядрах нейронов после обучения. Было продемонстрировано общее увеличение содержания HDAC4 в ядрах нейронов, однако это правило нарушалось для потенциальных клеток энграммы, где авторы регистрировали очень слабое перекрытие между Fos-положительными клетками (маркер нейронов энграммы) и ядерно-локализованной HDAC4. Было показано, что нарушение продукции HDAC4/5 продлевает экспрессию некоторых немедленных ранних генов (до 5 часов), увеличивает количество Fos- и Egr1-положительных клеток (примерно в 1,5–2 раза) и сопровождается когнитивными нарушениями в серии поведенческих тестов. С учетом других данных, полученных авторами, активность HDAC4/5, фактически, ограничивает «размер» энграммы (количество нейронов, подвергающихся морфо-функциональным изменениям в ответ на внешние стимулы) посредством пространственно-временного контроля транскрипции генов в нейронах.

Транспортируемые в ядро дефосфорилированные HDAC IIa не могут связываться с хроматином напрямую, специфическое взаимодействие их *N*-концевого фрагмента с транскрипционными факторами и *C*-концевого участка с ко-репрессорами обеспечивает привлечение сложных мультибелковых комплексов в определенные области хроматина [44, 51, 56, 58, 63, 64]. Репрессорные функции низкоактивных по своей природе HDAC IIa (HDAC4/5) во многом зависят от избирательного взаимодействия с ферментативно активными представителями HDAC I (HDAC3) в составе мультибелковых комплексов NCoR/SMRT (рис. 1, *а*) [44, 51, 56, 64].

Возникает вопрос о том, какова функция малоактивных представителей HDAC IIa в активных репрессорных комплексах? В одной из работ было показано, что потеря каталитического домена HDAC4 не сказывается на ее функциях в мозге, связанных с регуляцией транскрипции генов пластичности [58]. Полученные данные позволяют предполагать, что каталитически малоактивные представители HDAC IIa могут служить специфической платформой для привлечения других репрессорных белков. По некоторым данным, связывание HDAC IIa (и ассоциированных с ними транскрипционных факторов) с предсуществующими каталитически активными HDAC3-NCoR/SMRT комплексами обеспечивает дополнительный уровень специфичности при таргетировании образованных репрессорных комплексов в промоторные области генов [44]. Было обнаружено, что представители HDAC IIa (HDAC4/5) могут взаимодействовать с белком гетерохроматина HP1, который распознает и связывается с метилированным H3K9 сайтом на хроматине, а кроме того, привлекает гистонметилтрансферазу SUV39H1 [63]. Ко-локализация HDAC IIa с SUV39H1 в

мультибелковых комплексах (рис. 1, *а*), а также приведенные выше данные о взаимодействии HDAC IIa/HDAC I и SUV39H1/HDAC I могут объяснять функциональную связанность процессов деацетилирования и метилирования гистонов кооперативным действием упомянутых репрессорных комплексов или даже существованием репрессорных комплексов более высокого порядка [6, 44, 46, 56, 63].

ДНК-метилтрансферазы (DNMT). Отдельную и довольно значительную роль в механизмах пластичности и памяти отводят представителям семейства ДНК-метилтрансфераз (DNMT), ответственным за поддержание существующего статуса метилирования участков ДНК (DNMT1) и создание новых метильных меток (DNMT3a, DNMT3b) [21, 24, 52, 65]. По литературным данным, пластические процессы в нервной системе сопряжены со смещением существующего баланса в сторону метилирования ДНК в промоторах генов-супрессоров памяти (фосфатазы *Ppp1cc*, *Ppp3ca*), параллельно с которым происходит быстрое деметилирование в промоторах генов пластичности (*Reln*) [21, 65].

С учетом данных о сравнительно низкой избирательности DNMT возникает вопрос о том, каким образом в определенных последовательностях ДНК генов может быть сгенерирован специфический паттерн метилирования. Привлечение DNMT в определенные локусы может происходить с учетом локального эпигенетического ландшафта, поскольку появление меток метилирования гистонов в участках неактивного хроматина зачастую предшествует метилированию ДНК [66]. Было показано, что в *N*-концевом фрагменте *de-novo* метилтрансфераз (DNMT3) содержатся домены, распознающие репрессорные гистоновые метки [52, 67]. Кроме того, привлечение DNMT в соответствующие участки хроматина может происходить опосредованно, за счет взаимодействия с гистонметилтрансферазами (SUV39H1, рис. 1, *а*) и другими регуляторными молекулами [49, 66–68].

Для осуществления эффективного контроля транскрипции генов в *N*-концевых фрагментах молекул DNMT располагаются сайты взаимодействия с гистондеацетилазами (HDAC1/2) [43, 47, 49, 52]. ДНК-метилтрансферазы могут кооперироваться друг с другом и с HDAC1 (рис. 1, *а*), формируя мультибелковые репрессорные комплексы в промоторных областях отдельных генов [49]. Отдельные данные указывают на то, что HDAC играют центральную роль в таких комплексах, поскольку ко-репрессорные функции представителей семейства DNMT3 могут быть реализованы независимо от функциональной целостности каталитического домена [43, 47]. Вдобавок к этому, применение неспецифических блокаторов HDAC оказывается достаточным для диссоциации DNMT/HDAC репрессорных комплексов из промоторных областей и активации транскрипции соответствующих генов-мишеней [43, 49]. Было показано, что снятие «молекулярных тормозов» в промоторных участках генов-мишеней сопровождается снижением метилирования ДНК и ростом ацетилирования гистонов [49].

Из анализа литературы не прослеживается причинно-следственная связь DNMT–HDAC взаимодействия. С одной стороны, метилирование ДНК в определенных локусах может служить сигналом для привлечения HDAC-ассоциированных репрессорных комплексов и конденсации хроматина, в результате чего соответствующие гены «фиксируются» в репрессированном состоянии. С другой стороны, присутствие HDAC/HMT-содержащих комплексов ремоделирования хроматина может обеспечить определенный эпигенетический ландшафт в участках хроматина, облегчающий узнавание различными ДНК-метилтрансферазами, создание меток метилирования ДНК и подавление транскрипционной активности генов. Так или иначе, индукция комплексных эпигенетических перестроек за счет координированной работы HDAC/HMT/DNMT-содержащих комплексов потенциально может обеспечить эффективный контроль транскрипции соответствующих генов-мишеней: предположительно, подавление работы отдельных генов – негативных регуляторов памяти и активацию некоторых генов пластичности.

Нитрозилирование как инструмент снятия «молекулярных тормозов». Оксид азота (NO) может выступать в качестве модулятора эпигенетического ландшафта в различных клетках [69]. Несмотря на имеющиеся данные об участии NO в реализации механизмов памяти у позвоночных и беспозвоночных животных, рассмотрение NO-зависимой долговременной пластичности в аспекте эпигенетической регуляции генов не получило большого резонанса [70, 71]. Согласно немногим данным, физиологическая стимуляция клеток и увеличение уровня внутриклеточного кальция приводят к активации нейрональной NO-синтазы (nNOS) и продукции NO, которая сопровождается S-нитрозилированием белковых мишеней, NO-зависимыми перестройками хроматина и активацией экспрессии генов пластичности (см. далее).

Вопреки распространенному мнению о том, что эффекты NO не имеют специфики, с помощью протеомного анализа в ядерных экстрактах кортикальных нейронов среди 3078

белков было идентифицировано всего 614 потенциальных белковых мишеней для NO-зависимого S-нитрозилирования [72]. В списке мишеней для нитрозилирования оказались некоторые гистондеацетилазы (HDAC1/2), субъединицы корепрессорных комплексов (Sin3a, NuRD), протеинфосфатазы (PP1, PP2A), транскрипционные факторы (CREB, YY1) и другие ядерные белки, участвующие в реорганизации структуры хроматина и регуляции транскрипции [53, 54, 72, 73]. При анализе нитрозилированных фрагментов белковых мишеней методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (liquid chromatography–tandem mass spectrometry) авторы идентифицировали уникальные мотивы – сайты нитрозилирования [72]. За редким исключением, мы не располагаем данными о том, как нитрозилирование сказывается на функциях белковых мишеней в физиологических условиях. По всей видимости, нитрозилирование может быть как дестабилизирующим фактором (в случае репрессорных комплексов с HDAC2), так и стабилизатором некоторых белковых комплексов (в случае комплексов GAPDH-Siah1) (см. далее).

В *in vitro* экспериментах было показано, что физиологические стимулы (Ca^{2+}, BDNF, NMDA, KCl) вызывают в нейронах и не-нейрональных клетках продукцию NO, сопряженную с S-нитрозилированием ряда белковых мишеней (HDAC2, CREB, рис. 1, *б*) [54, 72, 73]. Нитрозилирование HDAC2 по определенным сайтам в консервативном каталитическом домене не влияет на активность фермента, но, видимо за счет конформационных перестроек, приводит к высвобождению HDAC2 из комплексов с хроматином в промоторах некоторых генов пластичности (*Fos*, *Egr1*, *Vgf*, *Nos1*) и создает условия для связывания активаторов транскрипции [54]. Было показано, что под влиянием NO происходит нитрозилирование транскрипционного фактора CREB в *C*-концевом ДНК-связывающем домене [72] и его привлечение в промоторные области генов-мишеней [53]. В результате стимул-зависимое связывание HAT CBP с CREB приводит к росту ацетилирования гистонов и инициации транскрипции CREB-зависимых генов [53, 54].

Аналогичные данные были получены *in vivo* в ходе поведенческих экспериментов. При исследовании реактивации недавней памяти у мышей авторы обнаружили увеличение представленности меток ацетилированных гистонов в CA1 области гиппокампа, и в частности в промоторной области гена пластичности *Fos*, которое было связано с нитрозилированием HDAC2 и высвобождением гистондеацетилазы из комплексов с хроматином (рис. 1, *б*) [71]. Любопытно, что продолжительность нитрозилирования HDAC2 коррелирует с критическим временным окном реконсолидации памяти (около 6 часов) [71], свидетельствуя в пользу высказанной ранее гипотезы о функционировании HDAC в качестве «молекулярных тормозов» при пластических изменениях в нервной системе [41]. Дополнительные эксперименты дают основание считать, что извлечение недавней памяти сопряжено с временной лабилизацией памяти, отчасти обусловленной NO-зависимым S-нитрозилированием HDAC2, увеличением ацетилирования гистонов и индукции транскрипции генов пластичности [71]. Полученные результаты согласуются с другими работами о роли NO в лабилизации памяти при реконсолидации [70].

Сравнение динамики молекулярных процессов в гиппокампе мышей при исследовании недавней и отставленной памяти выявило наличие NO-зависимой регуляции эпигенетического ландшафта в первом случае и отсутствие регуляции – во втором [71]. По всей видимости, наблюдаемые различия связаны с изменением вовлеченности сетей гиппокампа в обеспечение недавней и отставленной памяти [29]. Мы не исключаем, что при исследовании отставленной памяти в активных энграммах префронтальной коры могут быть найдены молекулярные изменения, аналогичные описанным в гиппокампе.

Существование ядерной функции NO в физиологических условиях может восприниматься с долей скептицизма, учитывая сведения об удаленной от ядра локализации nNOS, нестабильности продуцируемых молекул NO (время жизни всего несколько секунд) и, как следствие, недоступности ядерных белков для S-нитрозилирования. Однако, с помощью NO-связывающей флуоресцентной метки в активированных нейронах было показано быстрое накопление NO в цитоплазме и ядре [54]. Возможность аккумуляции NO в ядре была описана в другой работе, посвященной исследованию белок-белкового транснитрозилирования как механизма избирательного «перебрасывания» NO групп на некоторые ядерные белки [73]. Авторы обнаружили, что цитоплазматические белки GAPDH подвергаются нитрозилированию (SNO-GAPDH) и в этой форме транспортируются в ядро в комплексах с белками Siah1, имеющими сигналы ядерной локализации (рис. 1, *б*). Было экспериментально доказано, что SNO-GAPDH служат физиологическими источниками NO-групп для селективного нитрозилирования ядерных белков – мишеней GAPDH (HDAC2, SIRT1), но не цитоплазматических белков (β-тубулин).

Представленная схема специфического белок-белкового «перебрасывания» NO групп, предположительно, может быть реализована с участием других белковых «носителей» и является довольно распространенным элементом физиологических и патологических сигнальных каскадов в нервных клетках [72, 74]. Похоже, что влияние нитрозильных комплексов не ограничивается регуляцией ацетилирования гистонов, но может затрагивать также метилирование гистонов. В активированных нейронах коры элементы попавших в ядро нитрозилированных комплексов (Siah1) могут вызывать деградацию SUV39H1 (рис. 1, *б*), что выражается в снижении количества репрессорных меток H3K9me3 и облегчает CREB-зависимую транскрипцию генов [75].

Фосфорилирование как инструмент контроля «молекулярных тормозов». Поддержание определенного уровня фосфорилирования клеточных мишеней за счет скоординированной работы различных протеинкиназ и протеинфосфатаз является неотъемлемым компонентом пластических и когнитивных процессов в нервной системе [25, 40, 48, 76–78]. В рамках данного обзора мы не будем останавливаться на важных синаптических функциях протеинкиназ и протеинфосфатаз, но попробуем рассмотреть на конкретных примерах, как в нейронах и не-нейрональных клетках различные представители этих групп оперируют на уровне хроматина напрямую (фосфорилирование гистонов), а также опосредованно за счет изменения работы различных эпигенетических агентов [48, 77, 79, 80].

Роль фосфатаз в стабилизации «молекулярных тормозов». По имеющимся сведениям, установление равновесия между работой протеинкиназ и фосфатаз в состоянии покоя направлено на стабилизацию «молекулярных тормозов». В покое в не-нейрональных клетках и нейронах ядерные фосфатазы (PP1, PP4) взаимодействуют с различными гистондеацетилазами (HDAC1/2; HDAC3) и гистондеметилазами (LSD1) с образованием стабильных ферментативно-активных репрессорных комплексов на хроматине (рис. 1, *а*) [45, 48, 50, 81, 82]. Цитоплазматические фосфатазы (PP2A) в неактивных не-нейрональных клетках осуществляют дефосфорилирование представителей HDAC IIa, что служит сигналом для их транспортировки из цитоплазмы в ядро и облегчает взаимодействие с ядерными репрессорными белками [51, 64].

По некоторым данным, сформированные мультибелковые репрессорные комплексы, состоящие из гистондеацетилаз (HDAC I; HDAC IIa), фосфатаз и гистондеметилаз (рис. 1, *а*), могут кооперативно работать над стабилизацией «молекулярных тормозов» и подавлять транскрипцию генов пластичности в покое. В образцах мозга мышей было показано, что присутствие фосфатазы PP1 в промоторных областях отдельных генов пластичности (*CREB*, *Nfkb1*) отрицательно коррелирует с некоторыми активными сайт-специфичными модификациями хроматина (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование), что отражается на транскрипционной активности соответствующих генов [48, 77]. Потеря/снижение ферментативной активности любого из компонентов (PP1, HDAC I, LSD1) сопровождается дестабилизацией репрессорных комплексов и их диссоциацией из связи с хроматином, иными словами, снятием «молекулярных тормозов» со специфических генов-мишеней [45, 48, 50, 77, 81]. Подавление активности PP1 *in vivo* в мозге трансгенных мышей коррелирует с падением деацетилазной активности в ядре и увеличением представленности активных меток гистонов в отдельных регионах мозга [25, 48, 77]. Полученные данные объясняют, каким образом использование ингибиторов гистондеацетилаз и протеинфосфатаз в электрофизиологических и поведенческих экспериментах приводит к сходным изменениям синаптической пластичности и эффективности обучения животных [77, 83].

Хроническое нарушение дефосфорилирования эпигенетических мишеней *in vitro* в культурах кортикальных нейронов и *in vivo* в образцах мозга трансгенных мышей сопровождается изменением экспрессии целого спектра генов [50, 84]. В числе снизивших свою экспрессию были охарактеризованы группы генов, вовлеченных в трансмембранную передачу сигналов и метаболические процессы, тогда как целые кластеры генов, связанных с транскрипцией/трансляцией межклеточными коммуникациями, были активированы [84]. Эти данные хорошо согласуются с результатами поведенческих экспериментов, где через сутки после обучения наблюдается увеличение экспрессии генов, вовлеченных в синаптическую передачу сигналов, а также снижение экспрессии генов – регуляторов метаболических процессов [20]. Полученные данные дают представление о затронутых в ходе изменения баланса фосфорилирования клеточных процессах, возможно, указывая на участие фосфатаз в поддержании метаболического транскриптома в норме (гомеостаз). Смещение базового равновесия в сторону фосфорилирования мишеней, наоборот, облегчает включение пластического транскриптома.

Роль протеинкиназ в дестабилизации «молекулярных тормозов» и стимул-зависимой индукции эпигенетических перестроек. Пластические про-

цессы в нервной системе сопряжены с активацией и ядерной транслокацией различных протеинкиназ, активный импорт некоторых протеинкиназ (CaMKIδ, Erk, PKCζ, PKMζ) в ядро в ответ на физиологические нагрузки описан в нейронах и не-нейрональных клетках [80, 85–88]. Временная динамика ядерных транслокаций довольно сильно отличается для разных протеинкиназ, что может указывать на различия в их субстратной специфичности [80, 86, 88]. Транспортируемые в ядро протеинкиназы могут играть особую роль в молекулярных механизмах обучения и памяти, осуществляя точечный пространственный и временной контроль эпигенетического ландшафта и экспрессии определенных групп генов.

Стимул-специфичное фосфорилирование эпигенетических регуляторов вызывает конформационные перестройки, приводящие к потере ферментативной активности (HDAC I, DNMT1) или изменению внутриклеточной локализации (HDAC IIa) репрессорных белков, временной дестабилизации соответствующих репрессорных комплексов и снятию «молекулярных тормозов» (рис. 1, *в*). На сегодняшний день часть данных получена на не-нейрональных клетках, тем не менее схожие принципы регуляции могут присутствовать и в нейронах. Было показано, что гиперфосфорилирование HDAC1/2 сопровождается падением деацетилазной активности и приводит к распаду связей HDAC1/2 с ко-репрессорными белками или транскрипционными факторами и высвобождению HDAC1/2 из связи с хроматином (рис. 1, *в*) [45]. Фосфорилирование гистондеметилазы LSD1 в нейронах не влияет на ее ферментативную активность, но сопровождается конформационными перестройками и дестабилизацией комплексов LSD1 с репрессорными белками HDAC1/2 и CoREST (рис. 1, *в*) [50]. По некоторым данным, сайты фосфорилирования обнаружены в последовательностях DNMT, что, в сочетании с отрывочными экспериментальными данными, делает их потенциальными мишенями для протеинкиназ [52, 67, 89]. Особый интерес в рамках нашего обзора представляет работа Lavoie et al. [89], в которой были продемонстрированы способности отдельных представителей семейства PKC модифицировать DNMT1. Фосфорилирование DNMT1 под действием PKCζ вызывает снижение ее ферментативной активности (рис. 1, *в*) и сопровождается общим падением уровня метилирования ДНК в промоторных областях генов в не-нейрональных клетках. На основании приведенных данных мы предполагаем, что стимул-зависимый транспорт протеинкиназ (PKCζ и, возможно, других изоформ) в ядро может приводить к снижению метилтрансферазной активности DNMT, изменению профиля метилирования ДНК и модуляции экспрессии генов в активных нейронах.

Стимул-зависимое фосфорилирование представителей HDAC IIa активированными Ca-зависимыми киназами (CaMK I, II, IV; Erk1/2) приводит к нарушению взаимодействия HDAC IIa с другими репрессорными белками и их экспорту из ядра в цитоплазму (рис. 1, *в*), тем самым ограничивая доступ репрессорных молекул HDAC IIa к генам-мишеням [51, 60, 61, 63].

Таким образом, временная стимул-специфичная дестабилизация репрессорных комплексов, связанная со снижением активности или внутриклеточной локализации входящих в их состав репрессорных белков, открывает «окно возможностей» для индукции эпигенетических перестроек и активации транскрипции генов-мишеней. Было показано, что в ответ на деполяризацию клеток и увеличение концентрации кальция транспортируемые в ядро протеинкиназы могут стимулировать фосфорилирование гистонов [79] и компонентов активаторных комплексов, в частности некоторых транскрипционных факторов (CREB, C/EBP, Elk1) и HAT [80, 86, 87, 90–93]. По некоторым данным, фосфорилирование может облегчать взаимодействие транскрипционных факторов (TF) с их ко-активаторами HAT [94]. Отдельные работы свидетельствуют, что фосфорилирование CREB не является обязательным условием CREB-зависимой транскрипции генов, по мере взросления организма лимитирующим фактором активации CREB–CBP сигнального каскада становится фосфорилирование HAT CBP [93, 95]. В нескольких работах удалось установить, что HAT CBP может служить мишенью для сайт-специфичного фосфорилирования целым рядом протеинкиназ (CaMKIV, MAPK, представители aPKC), и в комплексах с транскрипционными факторами CREB или Elk1 фосфорилированная CBP активирует транскрипцию соответствующих генов/репортерных конструктов [80, 91–93, 96].

Из достаточно большого списка мишеней в рамках пластических процессов и механизмов памяти наибольший интерес представляют компоненты CREB–CBP сигнального пути [83, 97]. В ходе анализа литературы мы заметили, что основная масса работ на нейронах и не-нейрональных клетках указывает на ключевую, хотя и не исключительную роль атипичных протеинкиназ (aPKC) в регуляции работы CBP [80, 91, 92]. В ее последовательности был обнаружен сайт связывания атипичных протеинкиназ

(Ser436), который в ответ на определенные стимулы подвергается фосфорилированию протеинкиназой PKCi в периферических тканях [91] и протеинкиназами Cζ/Mζ в мозге [80, 92, 93]. Фосфорилирование по сайту Ser436 критически необходимо для рекрутирования CBP в промоторные области генов-мишеней, взаимодействия с CREB и индукции перестроек хроматина [80, 92, 93]. Было показано, что в развивающемся мозге aPKC-зависимое фосфорилирование приводит к связыванию CBP с промоторными областями некоторых развитийных генов и регуляции дифференцировки клеток-предшественников в корковой зоне [92]. Во взрослом мозге aPKC–CBP сигнальный путь контролирует нейрогенез и критически необходим для формирования и длительного хранения гиппокамп-зависимых форм памяти [93]. Полученные данные согласуются с результатами экспериментов на позвоночных и беспозвоночных животных, у которых нарушение хранения памяти, вызванное введением блокаторов aPKC, можно компенсировать увеличением ацетилирования гистонов за счет нарушения ре-ассоциации репрессорных комплексов с помощью HDAC ингибиторов [80, 98].

Приведенные данные демонстрируют, что протеинкиназы служат важнейшим связующим звеном между зависимыми от активности синаптическими изменениями на периферии клетки и процессами, протекающими в ядре. Активация клеток и увеличение уровня кальция стимулируют транспортировку некоторых PK в ядро, где происходит стимул-зависимое фосфорилирование связанных с хроматином белковых регуляторов (рис. 1, *в*), временное снятие «молекулярных тормозов» и облегчение формирования активаторных комплексов. Сопряженное появление различных активных меток гистонов во время формирования и/или извлечения памяти может быть результатом взаимодействия ядерных протеинкиназ с TF-HAT на хроматине, при котором близлежащие гистоны подвергаются двойному воздействию: ацетилированию активированными HAT и фосфорилированию соответствующими PK [25, 48, 79]. Результатом комплексных перестроек хроматина и привлечения активаторных молекул будет включение определенных транскрипционных программ, направленных на изменение эффективности синаптических связей и изменение «статуса» активированных нейронов в сети. По всей видимости, закрытие «критического окна» пластичности и восстановление базовых характеристик в промоторных областях генов-мишеней координируется вновь собранными репрессорными комплексами.

ПАМЯТЬ: ЧТО ОСТАЕТСЯ ПОСЛЕ ОБУЧЕНИЯ

Структурные изменения хроматина (посттрансляционные модификации гистонов) являются неотъемлемой частью процессов, связанных с формированием памяти. Снятие молекулярных тормозов открывает «критическое окно» для глобальных пластических изменений, запуска специфических транскрипционных программ и модуляции эффективности синаптических связей (см. выше). В частности, это подтверждается данными РНК-секвенирования небольших групп клеток и фрагментов ткани гиппокампа, согласно которым обучение сопровождается специфическими изменениями экспрессии целых кластеров поздних генов, связанных с синаптическими функциями, субъединицами рецепторов и ионных каналов [20, 99]. В литературе обсуждается обратимый характер посттрансляционных модификаций гистонов, который не исключает сохранения некоторых довольно локальных перестроек в регуляторных областях отдельных генов, но оставляет открытым вопрос о способах поддержания пластических изменений на определенном уровне в течение долгого времени [25, 26, 79].

Результаты секвенирования наводят на мысль, что ключом к пониманию этого могут быть процессы, связанные со стимул-специфичным изменением и стабильным поддержанием определенного профиля метилирования ДНК в отдельных межгенных, внутригенных и промоторных участках генов до следующего акта снятия «молекулярных тормозов» в ответ на значимые стимулы (например, напоминание) [3, 20]. Важнейшая роль процессов метилирования ДНК в механизмах пластичности была проиллюстрирована на беспозвоночных, где исследователи смогли искусственно воссоздать специфический след памяти у необученных моллюсков *Aplysia* путем инъекции им фракций РНК, выделенных из нервной системы обученных животных [100]. Было показано, что инъекции факторов (предположительно, некодирующих РНК), содержащихся в нейронах обученных животных, генерируют определенный паттерн метилирования ДНК, своего рода, «эпигенетическую энграмму», которую можно разрушить посредством введения блокаторов DNMT. На млекопитающих было показано, что увеличение продукции ДНК-метилтрансферазы DNMT3a2 в специфической функциональной сети нейронов стимулирует изменение профиля метилирования генов синаптической пластичности и повышает стабильность этой энграммы при извлечении памяти (см. выше) [24]. Miller et

al. [21] пошли дальше и с помощью ингибиторов DNMT производили нарушение установленного профиля метилирования ДНК в префронтальной коре крыс через 30 дней после обучения. Оказалось, что локальное введение ингибитора DNMT отражается на характере экспрессии генов и приводит к нарушению хранения отставленной памяти (remote memory).

При детальном рассмотрении оказалось, что профиль метилирования ДНК в определенных участках хроматина контролирует возможность посадки фактора CTCF, ключевого регулятора 3D-организации хроматина [101]. За счет взаимодействия с удаленными участками ДНК и формирования петель CTCF может сближать регуляторные области генома (энхансеры, инсуляторы) с участками генов-мишеней и модулировать уровень их экспрессии [102]. Было показано, что CTCF специфически вовлечен в регуляцию экспрессии генов пластичности и памяти в гиппокампе и префронтальной коре [103, 104]. При исследовании влияния CTCF на недавнюю гиппокамп-зависимую память были получены противоречивые результаты, которые не позволяют сделать однозначного вывода, но и не отрицают возможной роли CTCF в гиппокампе при определенных условиях [103, 104]. Генетические манипуляции с количеством CTCF в возбуждающих и тормозных сетях нейронов префронтальной коры демонстрируют критическую роль этого фактора в регуляции синаптической пластичности и длительном (4 недели) хранении памяти [104]. Подавление продукции CTCF приводит к изменению базовой экспрессии разных групп генов [103, 104]. Полученные данные дают основания считать, что CTCF поддерживает определенную 3D-организацию хроматина, при которой базовая экспрессия таких мишеней, как HDAC3 и HDAC7, находится на достаточно низком уровне [103]. Кроме того, при обучении в гиппокампе мышей с дефицитом CTCF наблюдается стимул-специфичное увеличение экспрессии генов-супрессоров памяти (*Ppp1c*) и нарушение экспрессии целого ряда генов пластичности (*Arc*, *Bdnf*, *Reln*) [103]. Нарушение экспрессии генов пластичности в условиях недостатка CTCF может быть связано с изменением архитектуры хроматина в этих локусах, о чем свидетельствует потеря части CTCF-зависимых контактов генов *Arc* и *Bdnf* с другими участками на хромосоме [103].

Полученные данные указывают на то, что характер метилирования ДНК в определенных локусах хроматина и метил-зависимые способы его трехмерной организации могут служить стабильной молекулярной основой реализации определенных транскрипционных программ, требуемых для регуляции пластичности и поддержания/хранения памяти неопределенно долгое время.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск специфических механизмов для управления когнитивными процессами в норме и при патологиях довольно остро стоит в рамках современной нейробиологии. На сегодняшний день происходит переключение внимания исследователей на молекулярные процессы, протекающие в ядре, поскольку изменение работы генома лежит в основе адаптивных функций организма, в том числе обучения и памяти. В рамках настоящего обзора мы попытались суммировать некоторые накопившиеся в литературе данные и рассмотреть в деталях предпосылки и механизмы эпигенетических перестроек, которые на сетевом и клеточном уровне могут обеспечить специфический контроль работы генов. Оперируя на уровне хроматина, различные эпигенетические агенты в составе сложных мультибелковых репрессорных комплексов координированно и кооперативно функционируют в качестве «молекулярных тормозов» (molecular brake pad), избирательно сохраняя низкий уровень экспрессии генов пластичности в покое (см. выше). Активация нейронов в ответ на физиологически значимые стимулы запускает серию биохимических событий (фосфорилирование, нитрозилирование), результатом которых является временное снятие «молекулярных тормозов» и открытие «критического окна» для глобальных и локальных эпигенетических перестроек, активации специфических транскрипционных программ и модуляции эффективности синаптических связей (см. выше). Довольно сложным вопросом для нас остается то, как устроена система специфической «навигации» эпигенетических агентов, и их привлечение в регуляторные области определенных групп генов. Мы попытались представить в обзоре некоторые сведения по этой теме, однако продолжение исследования, на наш взгляд, требует детального рассмотрения роли различных групп некодирующих РНК, в огромном количестве представленых в нервной ткани. По некоторым данным, малоизученные на сегодняшний день некодирующие РНК могут участвовать в изменении эпигенетического ландшафта и служить важнейшим элементом тонкой регуляции работы определенных генов, в том числе генов пластичности [105].

Другим не менее важным аспектом является обнаружение стабильной молекулярной основы

для поддержания и сохранения соответствующих пластических изменений, т.е. памяти. На сегодняшний день мнения исследователей единогласно сходятся на метилировании ДНК как конечной и наиболее устойчивой системе хранения информации в клетке [3, 21, 24]. В ходе исследований данная концепция претерпевает усложнения. Отрывочные данные дают основания считать, что сохранение определенной пространственной организации хроматина, представляющее метил-зависимый процесс, критически важно для поддержания транскрипционных программ [103, 104]. Возможно, что стимул-зависимое метилирование ДНК провоцирует изменение цитоархитектуры хроматина, которое «запирает» в определенном функциональном состоянии те или иные гены, однако данные предположения требуют отдельного детального исследования.

Экспериментальные данные, полученные на модельных организмах, демонстрируют перспективность разработки эпигенетических механизмов управления активностью генов. В последние годы получило развитие новое направление, позволяющее избирательно редактировать эпигеном [106]. Разработка технологий и систем для редактирования эпигенома имеет большой потенциал в рамках исследования развития мозга, когнитивных функций в норме и коррекции нейропатологий, обусловленных аномальной работой генов. Применение этих технологий является логичным продолжением текущих исследований, поскольку может вывести на новый уровень рассмотрение специфических механизмов регуляции нейропластичности и памяти.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-115-50290).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alberini, C. M., and Kandel, E. R. (2014) The regulation of transcription in memory consolidation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a021741, doi: 10.1101/cshperspect.a021741.
2. Kyrke-Smith, M., and Williams, J. M. (2018) Bridging synaptic and epigenetic maintenance mechanisms of the engram, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 369.
3. Halder, R., Hennion, M., Vidal, R. O., Shomroni, O., Rahman, R. U., Rajput, A., Centeno, T. P., van Bebber, F., Capece, V., Garcia Vizcaino, J. C., Schuetz, A. L., Burkhardt, S., Benito, E., Navarro Sala, M., Javan, S. B., Haass, C., Schmid, B., Fischer, A., and Bonn, S. (2016) DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory, *Nat. Neurosci.*, **19**, 102-110.
4. Jarome, T. J., and Lubin, F. D. (2014) Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **115**, 116-127.
5. Penney, J., and Tsai, L. H. (2014) Histone deacetylases in memory and cognition, *Sci. Signal.*, **7**, re12, doi: 10.1126/scisignal.aaa0069.
6. Kim, S., and Kaang, B. K. (2017) Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory, *Exp. Mol. Med.*, **49**, e281.
7. Montarolo, P. G., Goelet, P., Castellucci, V. F., Morgan, J., Kandel, E. R., and Schacher, S. (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*, *Science*, **234**, 1249-1254.
8. Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J. H., Miniaci, M. C., Schwartz, J. H., Thanos, D., and Kandel, E. R. (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure, *Cell*, **111**, 483-493.
9. Ganai, S. A., Ramadoss, M., and Mahadevan, V. (2016) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors – emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration, *Curr. Neuropharmacol.*, **14**, 55-71.
10. Latcheva, N. K., Viveiros, J. M., Waddell, E. A., Nguyen, P. T. T., Liebl, F. L. W., and Marenda, D. R. (2018) Epigenetic crosstalk: pharmacological inhibition of HDACs can rescue defective synaptic morphology and neurotransmission phenotypes associated with loss of the chromatin reader Kismet, *Mol. Cell. Neurosci.*, **87**, 77-85.
11. Торопова К. А., Анохин К. В., Тиунова А. А. (2014) Блокада деацетилирования гистонов в мозге модулирует экспрессию транскрипционных факторов c-Fos и ZENK и потенциирует образование долговременной памятиу новорожденных цыплят, *Журнал Высшей Нервной Деятельности им. И.П. Павлова*, **64**, 551-561.
12. Zuzina, A., Vinarskaya, A., and Balaban, P. (2020) Histone deacetylase inhibitors rescue the impaired memory in terrestrial snails, *J. Compar. Physiol. A*, **206**, 639-649, doi: 10.1007/s00359-020-01422-w.
13. Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T. J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J. E., DePinho, R. A., Jaenisch, R., and Tsai, L. H. (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity, *Nature*, **459**, 55-60.
14. Morris, M. J., Mahgoub, M., Na, E. S, Pranav, H., and Monteggia, L. M. (2013) Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning, *J. Neurosci.*, **33**, 6401-6411.
15. Ванюшин Б. Ф., Тушмалова Н. А., Гуськова Л. В. (1974) Метилирование ДНК мозга как показатель участия генома в механизмах индивидуально приобретенной памяти, *Доклады АН СССР*, **219**, 742-744.

16. Гуськова Л. В., Бурцева Н. Н., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф. (1977) Уровень метилирования ДНК ядер нейронов и глии коры больших полушарий мозга крыс и его изменения при выработке условного рефлекса, *Доклады АН СССР*, **233**, 993-996.
17. Holliday, R. (1999) Is there an epigenetic component in long-term memory? *J. Theor. Biol.*, **200**, 339-341.
18. Day, J. J., and Sweatt, J. D. (2010) DNA methylation and memory formation, *Nat. Neurosci.*, **13**, 1319-1323.
19. Pearce, K., Cai, D., Roberts, A. C., and Glanzman, D. L. (2017) Role of protein synthesis and DNA methylation in the consolidation and maintenance of long-term memory in *Aplysia*, *Elife*, **6**, e18299.
20. Duke, C. G., Kennedy, A. J., Gavin, C. F., Day, J. J., and Sweatt, J. D. (2017) Experience-dependent epigenomic reorganization in the hippocampus, *Learn. Mem.*, **24**, 278-288.
21. Miller, C. A., Gavin, C. F., White, J. A., Parrish, R. R., Honasoge, A., Yancey, C. R., Rivera, I. M., Rubio, M. D., Rumbaugh, G., and Sweatt, J. D. (2010) Cortical DNA methylation maintains remote memory, *Nat. Neurosci.*, **13**, 664-666.
22. Gupta, S., Kim, S. Y., Artis, S., Molfese, D. L., Schumacher, A., Sweatt, J. D., Paylor, R. E., and Lubin, F. D. (2010) Histone methylation regulates memory formation, *J. Neurosci.*, **30**, 3589-3599.
23. Lesburguères, E., Gobbo, O. L., Alaux-Cantin, S., Hambucken, A., Trifilieff, P., and Bontempi, B. (2011) Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory, *Science*, **331**, 924-928.
24. Gulmez Karaca, K., Kupke, J., Brito, D. V. C., Zeuch, B., Thome, C., Weichenhan, D., Lutsik, P., Plass, C., and Oliveira, A. M. M. (2020) Neuronal ensemble-specific DNA methylation strengthens engram stability, *Nat. Commun.*, **11**, 639.
25. Gräff, J., Woldemichael, B. T., Berchtold, D., Dewarrat, G., and Mansuy, I. M. (2012) Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation, *Nat. Commun.*, **3**, 991.
26. Gupta-Agarwal, S., Franklin, A. V., Deramus, T., Wheelock, M., Davis, R. L., McMahon, L. L., and Lubin, F. D. (2012) G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation, *J. Neurosci.*, **32**, 5440-5453.
27. Sui, L., Wang, Y., Ju, L. H., and Chen, M. (2012) Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **97**, 425-440.
28. Webb, W. M., Sanchez, R. G., Perez, G., Butler, A. A., Hauser, R. M., Rich, M. C., O'Bierne, A. L., Jarome, T. J., and Lubin, F. D. (2017) Dynamic association of epigenetic H3K4me3 and DNA 5hmC marks in the dorsal hippocampus and anterior cingulate cortex following reactivation of a fear memory, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **142**, 66-78.
29. Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L., and Tonegawa, S. (2017) Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory, *Science*, **356**, 73-78.
30. Бородинова А. А., Саложин С. В. (2016) Различия биологических функций BDNF и proBDNF в центральной нервной системе, *Журнал Высшей Нервной Деятельности им. И.П. Павлова*, **66**, 3-23.
31. Bosch, C., Muhaisen, A., Pujadas, L., Soriano, E., and Martínez, A. (2016) Reelin exerts structural, biochemical and transcriptional regulation over presynaptic and postsynaptic elements in the adult hippocampus, *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 138.
32. Valiati, F. E., Vasconcelos, M., Lichtenfels, M., Petry, F. S., de Almeida, R. M. M., Schwartsmann, G., Schröder, N., de Farias, C. B., and Roesler, R. (2017) Administration of a histone deacetylase inhibitor into the basolateral amygdala enhances memory consolidation, delays extinction, and increases hippocampal BDNF levels, *Front. Pharmacol.*, **8**, 415.
33. Hermey, G., Mahlke, C., Gutzmann, J. J., Schreiber, J., Blüthgen, N., and Kuhl, D. (2013) Genome-wide profiling of the activity-dependent hippocampal transcriptome, *PLoS One.*, **8**, e76903.
34. Benito, E., and Barco, A. (2015) The neuronal activity-driven transcriptome, *Mol. Neurobiol.*, **5**, 1071-1088.
35. Fowler, T., Sen, R., and Roy, A. L. (2011) Regulation of primary response genes, *Mol. Cell*, **44**, 348-360.
36. Herschman, H, R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters, *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 281-319.
37. Tyssowski, K. M., DeStefino, N. R., Cho, J. H., Dunn, C. J., Poston, R. G., Carty, C. E., Jones, R. D., Chang, S. M., Romeo, P., Wurzelmann, M. K., Ward, J. M., Andermann, M. L., Saha, R. N., Dudek, S. M., and Gray, J. M. (2018) Different neuronal activity patterns induce different gene expression programs, *Neuron*, **98**, 530-546.e11.
38. Tyssowski, K. M., Letai, K. C., Rendall, S. D., Tan, C., Nizhnik, A., Kaeser, P. S., and Gray, J. M. (2019) Firing rate homeostasis can occur in the absence of neuronal activity-regulated transcription, *J. Neurosci.*, **39**, 9885-9899.
39. Shepherd, J. D., and Bear, M. F. (2011) New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity, *Nat. Neurosci.*, **14**, 279-284.
40. Sacktor, T. C. (2011) How does PKMζ maintain long-term memory? *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**, 9-15.
41. McQuown, S. C., and Wood, M. A. (2011) HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **96**, 27-34.
42. Kelly, R. D., and Cowley, S. M. (2013) The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts, *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 741-749.
43. Fuks, F., Burgers, W. A., Godin, N., Kasai, M., and Kouzarides, T. (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription, *EMBO J.*, **20**, 2536-2544.
44. Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR, *Mol. Cell*, **9**, 45-57.
45. Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A., and Ahn, N. G. (2002) Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions, *J. Biol. Chem.*, **277**, 19618-19626.
46. Vaute, O., Nicolas, E., Vandel, L., and Trouche, D. (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 475-481.
47. Bai, S., Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Yoon, S. O., and Jacob, S. T. (2005) DNA methyltransferase 3b regulates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by recruiting histone deacetylase 2, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 751-766.

48. Koshibu, K., Graff, J., Beullens, M., Heitz, F. D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., and Mansuy, I. M. (2009) Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory, *J. Neurosci.*, **29**, 13079-13089.
49. Kundakovic, M., Chen, Y., Guidotti, A., and Grayson, D. R. (2009) The reelin and GAD67 promoters are activated by epigenetic drugs that facilitate the disruption of local repressor complexes, *Mol. Pharmacol.*, **75**, 342-354.
50. Toffolo, E., Rusconi, F., Paganini, L., Tortorici, M., Pilotto, S., Heise, C., Verpelli, C., Tedeschi, G., Maffioli, E., Sala, C., Mattevi, A., and Battaglioli, E. (2014) Phosphorylation of neuronal lysine-specific demethylase 1LSD1/KDM1A impairs transcriptional repression by regulating interaction with CoREST and histone deacetylases HDAC1/2, *J. Neurochem.*, **128**, 603-616.
51. Mathias, R. A., Guise, A. J., and Cristea, I. M. (2015) Post-translational modifications regulate class IIa histone deacetylase (HDAC) function in health and disease, *Mol. Cell. Proteomics.*, **14**, 456-470.
52. Bayraktar, G., and Kreutz, M. R. (2018) Neuronal DNA methyltransferases: epigenetic mediators between synaptic activity and gene expression? *Neuroscientist*, **24**, 171-185.
53. Riccio, A., Alvania, R. S., Lonze, B. E., Ramanan, N., Kim, T., Huang, Y., Dawson, T. M., Snyder, S. H., and Ginty, D. D. (2006) A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons, *Mol. Cell*, **21**, 283-294.
54. Nott, A., Watson, P. M., Robinson, J. D., Crepaldi, L., and Riccio A. (2008) S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons, *Nature*, **455**, 411-415.
55. Louis Sam Titus, A. S. C., Sharma, D., Kim, M. S., and D'Mello, S. R. (2019) The Bdnf and Npas4 genes are targets of HDAC3-mediated transcriptional repression, *BMC Neurosci.*, **20**, 65.
56. Guenther, M. G., Barak, O., and Lazar, M. A. (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6091-6101.
57. Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., and Winrow, C. J. J. (2007) Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain, *Mol. Neurosci.*, **31**, 47-58.
58. Sando, R. 3rd, Gounko, N., Pieraut, S., Liao, L., Yates, J. 3rd, and Maximov, A. (2012) HDAC4 governs a transcriptional program essential for synaptic plasticity and memory, *Cell*, **151**, 821-834.
59. Zhu, Y., Huang, M., Bushong, E., Phan, S., Uytiepo, M., Beutter, E., Boemer, D., Tsui, K., Ellisman, M., and Maximov, A. (2019) Class IIa HDACs regulate learning and memory through dynamic experience-dependent repression of transcription, *Nat. Commun.*, **10**, 3469.
60. Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F. J., Huang, C. L., and Bading, H. (2003) Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5, *J. Neurochem.*, **85**, 151-159.
61. Schlumm, F., Mauceri, D., Freitag, H. E., and Bading, H. (2013) Nuclear calcium signaling regulates nuclear export of a subset of class IIa histone deacetylases following synaptic activity, *J. Biol. Chem.*, **288**, 8074-8084.
62. Josselyn, S. A., and Frankland, P. W. (2018) Memory allocation: mechanisms and function, *Annu. Rev. Neurosci.*, **41**, 389-413.
63. Zhang, C. L., McKinsey, T. A., and Olson, E. N. (2002) Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 7302-7312.
64. Paroni, G., Cernotta, N., Dello Russo, C., Gallinari, P., Pallaoro, M., Foti, C., Talamo, F., Orsatti, L., Steinkühler, C., and Brancolini, C. (2008) PP2A regulates HDAC4 nuclear import, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 655-667.
65. Miller, C. A., and Sweatt, J. D. (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation, *Neuron*, **53**, 857-869.
66. Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., and Patel, D. J. (2015) DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 519-532.
67. Denis, H., Ndlovu, M. N., and Fuks, F. (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms, *EMBO Rep.*, **12**, 647-656.
68. Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2305-2312.
69. Vasudevan, D., Bovee, R. C., and Thomas, D. D. (2016) Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes, *Nitric Oxide*, **59**, 54-62.
70. Balaban, P. M., Roshchin, M., Timoshenko, A. K., Gainutdinov, K. L., Bogodvid, T. K., Muranova, L. N., Zuzina, A. B., and Korshunova, T. A. (2014) Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails, *Eur. J. Neurosci.*, **40**, 2963-2970.
71. Gräff, J., Joseph, N. F., Horn, M. E., Samiei, A., Meng, J., Seo, J., Rei, D., Bero, A. W., Phan, T. X., Wagner, F., Holson, E., Xu, J., Sun, J., Neve, R. L., Mach, R. H., Haggarty, S. J., and Tsai, L. H. (2014) Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories, *Cell*, **156**, 261-276.
72. Smith, J. G., Aldous, S. G., Andreassi, C., Cuda, G., Gaspari, M., and Riccio, A. (2018) Proteomic analysis of S-nitrosylated nuclear proteins in rat cortical neurons, *Sci. Signal.*, **11**, aar3396, doi: 10.1126/scisignal.aar3396.
73. Kornberg, M. D., Sen, N., Hara, M. R., Juluri, K. R., Nguyen, J. V., Snowman, A. M., Law, L., Hester, L. D., and Snyder, S. H. (2010) GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1094-1100.
74. Nakamura, T., and Lipton, S. A. (2013) Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 239-249.
75. Sen, N., and Snyder, S. H. (2011) Neurotrophin-mediated degradation of histone methyltransferase by S-nitrosylation cascade regulates neuronal differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20178-20183.
76. Pi, H. J., and Lisman, J. E. (2008) Coupled phosphatase and kinase switches produce the tristability required for long-term potentiation and long-term depression, *J. Neurosci.*, **28**, 13132-13138.
77. Koshibu, K., Graff, J., and Mansuy, I. M. (2011) Nuclear protein phosphatase-1: an epigenetic regulator of fear memory and amygdala long-term potentiation, *Neuroscience*, **173**, 30-36.
78. Borodinova, A. A., Zuzina, A. B., and Balaban, P. M. (2017) Role of atypical protein kinases in maintenance of long-term memory and synaptic plasticity, *Biochemistry (Mosccow)*, **82**, 243-256.
79. Chwang, W. B., O'Riordan, K. J., Levenson, J. M., and Sweatt, J. D. (2006) ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning, *Learn. Mem.*, **13**, 322-328.
80. Ko, H. G., Kim, J. I., Sim, S. E., Kim, T., Yoo, J., Choi, S. L., Baek, S. H., Yu, W. J., Yoon, J. B., Sacktor, T. C., and

Kaang, B. K. (2016) The role of nuclear PKMζ in memory maintenance, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **135**, 50-56.
81. Canettieri, G., Morantte, I., Guzmán, E., Asahara, H., Herzig, S., Anderson, S. D., Yates, J. R. 3rd, and Montminy, M. (2003) Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 175-181.
82. Zhang, X., Ozawa, Y., Lee, H., Wen, Y. D., Tan, T. H., Wadzinski, B. E., and Seto, E. (2005) Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4, *Genes Dev.*, **19**, 827-839.
83. Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. A., Attner, M. A., Cabrera, S. M., McDonough, C. B., Brindle, P. K., Abel, T., and Wood, M. A. (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation, *J. Neurosci.*, **27**, 6128-6140.
84. Graff, J., Koshibu, K., Jouvenceau, A., Dutar, P., and Mansuy, I. M. (2010) Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity, *Learn. Mem.*, **17**, 355-363.
85. Wooten, M. W., Zhou, G., Wooten, M. C., and Seibenhener, M. L. (1997) Transport of protein kinase C isoforms to the nucleus of PC12 cells by nerve growth factor: association of atypical zeta-PKC with the nuclear matrix, *J. Neurosci. Res.*, **49**, 393-403.
86. Sakagami, H., Kamata, A., Nishimura, H., Kasahara, J., Owada, Y., Takeuchi, Y., Watanabe, M., Fukunaga, K., and Kondo, H. (2005) Prominent expression and activity-dependent nuclear translocation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Idelta in hippocampal neurons, *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 2697-2707.
87. Zhai, S., Ark, E. D., Parra-Bueno, P., and Yasuda, R. (2013) Long-distance integration of nuclear ERK signaling triggered by activation of a few dendritic spines, *Science*, **342**, 1107-1111.
88. Melgarejo da Rosa, M., Yuanxiang, P., Brambilla, R., Kreutz, M. R., and Karpova, A. (2016) Synaptic GluN2B/CaMKII-α signaling induces synapto-nuclear transport of ERK and Jacob, *Front. Mol. Neurosci.*, **9**, 66.
89. Lavoie, G., Estève, P. O., Laulan, N. B., Pradhan, S., and St-Pierre, Y. (2011) PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1, *BMC Biol.*, **9**, 31.
90. Wegner, M., Cao, Z., and Rosenfeld, M. G. (1992) Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta, *Science*, **256**, 370-373.
91. He, L., Sabet, A., Djedjos, S., Miller, R., Sun, X., Hussain, M. A., Radovick, S., and Wondisford, F. E. (2009) Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein, *Cell*, **137**, 635-646.
92. Wang, J., Weaver, I. C., Gauthier-Fisher, A., Wang, H., He, L., Yeomans, J., Wondisford, F., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2010) CBP histone acetyltransferase activity regulates embryonic neural differentiation in the normal and Rubinstein-Taybi syndrome brain, *Dev. Cell*, **18**, 114-125.
93. Gouveia, A., Hsu, K., Niibori, Y., Seegobin, M., Cancino, G. I., He, L., Wondisford, F. E., Bennett, S., Lagace, D., Frankland, P. W., and Wang, J. (2016) The aPKC-CBP pathway regulates adult hippocampal neurogenesis in an age-dependent manner, *Stem Cell Rep.*, **7**, 719-734.
94. Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bächinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., and Goodman, R. H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB, *Nature*, **370**, 223-226.
95. Briand, L. A., Lee, B. G., Lelay, J., Kaestner, K. H., and Blendy, J. A. (2015) Serine 133 phosphorylation is not required for hippocampal CREB-mediated transcription and behavior, *Learn. Mem.*, **22**, 109-115.
96. Impey, S., Fong, A. L., Wang, Y., Cardinaux, J. R., Fass, D. M., Obrietan, K., Wayman, G. A., Storm, D. R., Soderling, T. R., and Goodman, R. H. (2002) Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV, *Neuron.*, **34**, 235-244.
97. Barrett, R. M., Malvaez, M., Kramar, E., Matheos, D. P., Arrizon, A., Cabrera, S. M., Lynch, G., Greene, R. W., and Wood, M. A. (2011) Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory, *Neuropsychopharmacology*, **36**, 1545-1556.
98. Chen, S., Cai, D., Pearce, K., Sun, P. Y., Roberts, A. C., and Glanzman, D. L. (2014) Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in aplysia, *Elife*, **3**, e03896.
99. Rao-Ruiz, P., Couey, J. J., Marcelo, I. M., Bouwkamp, C. G., Slump, D. E., Matos, M. R., van der Loo, R. J., Martins, G. J., van den Hout, M., van IJcken, W. F., Costa, R. M., van den Oever, M. C., and Kushner, S. A. (2019) Engram-specific transcriptome profiling of contextual memory consolidation, *Nat. Commun.*, **10**, 2232.
100. Bédécarrats, A., Chen, S., Pearce, K., Cai, D., and Glanzman, D. L. (2018) RNA from trained aplysia can induce an epigenetic engram for long-term sensitization in untrained aplysia, *eNeuro*, **5**, doi: 10.1523/ENEURO.0038-18.2018.
101. Maurano, M. T., Wang, H., John, S., Shafer, A., Canfield, T., Lee, K., and Stamatoyannopoulos, J. A. (2015) Role of DNA methylation in modulating transcription factor occupancy, *Cell Rep.*, **12**, 1184-1195.
102. Phillips, J. E., and Corces, V. G. (2009) CTCF: master weaver of the genome, *Cell*, **137**, 1194-1211.
103. Sams, D. S., Nardone, S., Getselter, D., Raz, D., Tal, M., Rayi, P. R., Kaphzan, H., Hakim, O., and Elliott, E. (2016) Neuronal CTCF is necessary for basal and experience-dependent gene regulation, memory formation, and genomic structure of *BDNF* and *Arc*, *Cell Rep.*, **17**, 2418-2430.
104. Kim, S., Yu, N. K., Shim, K. W., Kim, J. I., Kim, H., Han, D. H., Choi, J. E., Lee, S. W., Choi, D. I., Kim, M. W., Lee, D. S., Lee, K., Galjart, N., Lee, Y. S., Lee, J. H., and Kaang, B. K. (2018) Remote memory and cortical synaptic plasticity require neuronal CCCTC-binding factor (CTCF), *J. Neurosci.*, **38**, 5042-5052.
105. Savell, K. E., Gallus, N. V., Simon, R. C., Brown, J. A., Revanna, J. S., Osborn, M. K., Song, E. Y., O'Malley, J. J., Stackhouse, C. T., Norvil, A., Gowher, H., Sweatt, J. D., and Day, J. J. (2016) Extra-coding RNAs regulate neuronal DNA methylation dynamics, *Nat. Commun.*, **7**, 12091, doi: 10.1038/ncomms12091.
106. Балабан П. М., Бородинова А. А. (2019) Нейрогенетические технологии исследования механизмов хранения памяти, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **105**, 1392-1405, doi: 10.1134/S0869813919110025.

EPIGENETIC REGULATION AS A BASIS FOR LONG-TERM CHANGES IN THE NERVOUS SYSTEM: IN SEARCH OF SPECIFICITY MECHANISMS*

Review

A. A. Borodinova and P. M. Balaban**

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 177485 Moscow, Russia; E-mail: borodinova.msu@mail.ru

Received June 1, 2020
Revised July 16, 2020
Accepted July 29, 2020

Adaptive long-term changes in the functioning of nervous system (plasticity, memory) are not written in the genome, but are directly associated with the changes in expression of many genes comprising epigenetic regulation. Summarizing the known data regarding the role of epigenetics in regulation of plasticity and memory, we would like to highlight several key aspects. (i) Different chromatin remodeling complexes and DNA methyltransferases can be organized into high-order multiprotein repressor complexes that are cooperatively acting as the "molecular brake pads", selectively restricting transcriptional activity of specific genes at rest. (ii) Relevant physiological stimuli induce a cascade of biochemical events in the activated neurons resulting in translocation of different signaling molecules (protein kinases, NO-containing complexes) to the nucleus. (iii) Stimulus-specific nitrosylation and phosphorylation of different epigenetic factors is linked to a decrease in their enzymatic activity or changes in intracellular localization that results in temporary destabilization of the repressor complexes. (iv) Removing "molecular brakes" opens a "critical time window" for global and local epigenetic changes, triggering specific transcriptional programs and modulation of synaptic connections efficiency. It can be assumed that the reversible post-translational histone modifications serve as the basis of plastic changes in the neural network. On the other hand, DNA methylation and methylation-dependent 3D chromatin organization can serve a stable molecular basis for long-term maintenance of plastic changes and memory.

Keywords: memory, learning, epigenetics, gene expression, histone deacetylase, DNA methylation, nitric oxide

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1159 – 1188

УДК 577.053, 616-006.04, 615.277.3

РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА: КЛЮЧ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ДОСТАВКИ В КЛЕТКИ*

Обзор

© 2020 А.А. Розенкранц[1,2], Т.А. Сластникова[2]**

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: aar@igb.ac.ru*

[2] *Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 15.06.2020
После доработки 23.07.2020
Принята к публикации 23.07.2020

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) – интегральный поверхностный белок, который обусловливает ответ клеток на ряд факторов роста. Увеличение его экспрессии и активности за счет мутаций являются одними из наиболее часто встречающихся признаков клеток многих видов рака. Разработка и клиническое применение средств блокирования активации EGFR стали ярким примером использования персонализованной таргетной медицины. Несмотря на очевидные успехи этого направления, в большинстве случаев излечение рака остается недостижимым. Причины этого, а также поиск возможных путей преодоления сложностей лечения привели к появлению огромного количества разработок новых методов лечения, опирающихся на использование сверхэкспрессии EGFR и его изменений для уничтожения раковых клеток. В обзоре рассмотрены и структурированы современные данные о строении, функционировании и внутриклеточном транспорте EGFR, его природных лигандах, а также запускаемых при активации EGFR сигнальных каскадах, особенностях экспрессии и активации EGFR при онкологических заболеваниях, а также о применяемых терапевтических подходах, направленных на блокировку сигнального пути EGFR. Подробно рассмотрены создаваемые подходы к адресной доставке внутрь раковых клеток с увеличенной экспрессией EGFR различных химиотерапевтических средств, радионуклидов, иммунотоксинов, фотосенсибилизаторов, а также перспективы генной терапии таких клеток-мишеней. Необходимо отметить, что все большее внимание уделяется разработке многофункциональных систем, как несущих несколько разных действующих агентов, так и обладающих несколькими зависящими от окружения транспортными функциями. Обсуждается потенциал систем, основанных на рецептор-опосредуемом эндоцитозе EGFR, их возможные достоинства и ограничения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рецептор эпидермального фактора роста, сверхэкспрессия, рак, эндоцитоз, направленная терапия рака, доставка лекарств.

DOI: 10.31857/S032097252009002X

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) является одним из наиболее изучаемых белков: количество научных публикаций в базе PubMed, описывающих изучение его структуры и свойств, а также функционирования в норме и патологии приближается к ста тысячам. Несмотря на это, многие аспекты его участия в регуляции процессов, протекающих в организме, остаются до сих пор недостаточно изученными, а постоянно увеличивающийся список создаваемых для воздействия на него веществ и оценка их действия требуют периодического систематического анализа, позволяющего выбрать наиболее перспективные направления исследования и разработки новых лекарственных препаратов. Являясь интегральным поверхностным рецептором, EGFR опосредует внешние сигналы целого семейства регуляторных факторов, наиболее известными из которых являются эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор рос-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, МНТ – модульные нанотранспортеры, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ФС – фотосенсибилизатор, ЭО – электроны Оже, ЭР – эндоплазматический ретикулум, EGF – эпидермальный фактор роста, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ErbB – гомолог B вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц (синоним EGFR/HER), mAb – моноклональные антитела, PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот, TGFα – трансформирующий фактор роста альфа, PRMT1 – аргинин-метилтрансфераза 1, ФДТ – фотодинамическая терапия.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 9, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

та альфа (TGFα) [1]. Взаимодействие этих внеклеточных сигнальных молекул с EGFR приводит к активации нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов: RAS/MAPK(ERK), PI3K/AKT/mTOR и JAK/STAT, что способствует пролиферации, ингибированию апоптоза и выживаемости клеток [2, 3]. Особое внимание привлекает участие EGFR в канцерогенезе и возможность использования этого рецептора для лечения онкологических заболеваний. Активация EGFR является одним из факторов, способствующих эпителиально-мезенхимальному переходу, который приводит к появлению фенотипа раковых стволовых клеток [4]. Его мутации и увеличение экспрессии часто приводят к возникновению и прогрессии злокачественных новообразований [5]. Увеличение количества EGFR в клетке встречается при многих онкологических заболеваниях (см. раздел «Экспрессия EGFR при онкологических заболеваниях»). Поэтому естественно, что EGFR является одним из значимых объектов таргетной терапии. Такие препараты, как цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб и нецитумумаб, представляющие собой моноклональные антитела к EGFR, предотвращающие активацию EGFR природными лигандами, уже широко применяются в клинике. Другим вариантом таргетной терапии, направленной на EGFR, является использование специфических ингибиторов фосфорилирования, к которым относятся гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, афатиниб и ряд других (см. раздел «Успехи и ограничения направленной блокировки сигнального пути EGFR»). К сожалению, далеко не все варианты опухолей с повышенной экспрессией EGFR или его мутациями с конститутивной активацией фосфорилирования отвечают на воздействие вышеупомянутых антител и ингибиторов из-за независимой активации нижележащих звеньев сигнальных цепей (киназ семейств RAS, BRAF), прежде всего, KRAS и BRAF, что делает применяемую терапию, направленную на EGFR, неэффективной.

Вариантом преодоления неэффективности в таких случаях является использование рецептор-опосредуемого эндоцитоза EGFR для специфической таргетной доставки в раковые клетки с повышенной экспрессией этого рецептора различных терапевтических, прежде всего, цитотоксических агентов, что позволяет уничтожать раковые клетки независимо от активации нижележащих сигнальных цепей. Для этой цели создаются как конъюгаты цитотоксических веществ с лигандами EGFR (как с природными, так и с синтетическими), так и более сложные молекулярные и надмолекулярные конструкции. К ним можно отнести наночастицы как с твердым ядром, так и липосомы, мицеллы и им подобные варианты, несущие цитотоксические вещества. Еще одним возможным вариантом является использование EGFR для транспорта в раковые клетки с помощью вирусов или синтетических систем доставки, генов, кодирующих фермент, превращающий пролекарство в цитотоксический продукт. Современные направления специфичной для раковых клеток доставки цитотоксического начала внутрь клеток с повышенной экспрессией EGFR, их перспективы и ограничения являются основной темой настоящего обзора.

EGFR КАК КОМПОНЕНТ СИГНАЛЬНОЙ СЕТИ

Активация EGFR приводит к целому ряду биологических реакций, включая пролиферацию клеток, миграцию и выживание, которые в норме призваны обеспечивать сохранность и регенерацию эпителия. Именно эти свойства делают нарушение регуляции EGFR важным и часто необходимым звеном развития многих видов онкологических заболеваний. Этот рецептор принадлежит к одному из семейств тирозинкиназ (ErbB или HER), состоящему из 4-х близкородственных мембранных рецепторов: EGFR/ErbB1/HER1, Neu/ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4. Все рецепторы ErbB (от avian erythroblastic leukemia viral oncogene B homolog – гомолог B вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц) человека являются крупными трансмембранными белками, содержат богатую цистеинами внеклеточную часть, единственный трансмембранный участок и внутриклеточную цитоплазматическую часть, состоящую из примембранного, тирозинкиназного и *C*-концевого доменов [6]. Внеклеточную часть EGFR, как и других ErbB, подразделяют на четыре домена, причем для связывания лиганда требуются контакты EGFR с доменами I и III. При этом происходит изменение конформации рецептора, которое обеспечивает появление выступающей «ручки» в домене II внеклеточной части рецептора. Выступающая «ручка» получает возможность взаимодействовать с соответствующей структурой другого ErbB. В обычном, не активированном, состоянии появлению этой димеризационной «ручки» препятствует взаимодействие домена II с IV доменом рецептора. Лиганд, взаимодействуя с I и III доменами рецептора, высвобождает «ручку» для взаимодействия с соседним рецептором [7]. Неактивные молекулы EGFR существуют на поверхности клеток в основном в виде мономеров не-

активных димеров и некоторой доли олигомеров, которые находятся в равновесии друг с другом [8]. Активация EGFR контролируется извне клетки соответствующими лигандами и приводит к образованию его гомодимеров и гетеродимеров с другими ErbB. Связывание активирующего лиганда приводит к сдвигу равновесия в сторону димеризации с образованием активных димеров и активации предсуществующих димеров. Это приводит к активации тирозинкиназного домена и специфическому фосфорилированию остатков тирозина цитоплазматической части рецептора-партнера в димере. К последовательностям с фосфорилированными остатками тирозина присоединяются соответствующие внутриклеточные сигнальные молекулы, что обеспечивает активацию сети взаимодействующих внутриклеточных сигнальных путей [9]. Таким образом, реализация сигнала от связывания внеклеточного регуляторного лиганда с рецептором, происходит с помощью фосфорилирования не только самого EGFR в результате гомодимеризации, но и его партнеров, в первую очередь, ErbB2, не имеющего собственного внеклеточного регуляторного лиганда [1]. В существенно меньшей степени прохождение сигнала от EGFR в клетку обеспечивается остальными рецепторами этого семейства ErbB3 [10, 11] и ErbB4 [12], которые являются тканеспецифичными и экспрессируются в основном в нервной ткани. Известно также, что, кроме родственных ErbB рецепторов, EGFR может образовывать димеры в мембране с другими рецепторными тирозинкиназами. Взаимодействие активированного EGFR с рецепторами тромбоцитарного фактора роста бета [13, 14], рецепторами фактора роста гепатоцитов/фактора мезенхимально-эпителиального перехода (mesenchymal-epithelial transition factor receptor, MET) [15] и родственного ему RON [16], а также рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R) [17] приводит к их фосфорилированию и к физиологически, и терапевтически значимым результатам в активируемых через эти рецепторы регуляторных внутриклеточных путях (рис. 1). Это означает, что ответ клетки на связывание лиганда с EGFR определяется не только наличием и количеством этого рецептора, но зависит также от набора и количества рецепторов-партнеров на клеточной поверхности. Кроме этого, ответ клетки на внешний сигнал зависит еще и от свойств связывающегося с EGFR фактора роста (см. раздел «Природные лиганды EGFR»).

Дополнительный уровень регуляции прохождения сигнала обеспечивает необходимость встречи с другим рецептором, что зависит от диффузионных свойств рецептора и его микрораспределения в плазматической мембране. Часть EGFR находится в олигомеризованном состоянии, что обеспечивает возможность фосфорилирования нескольких рецепторов в ответ на один связанный лиганд при низкой концентрации добавленного лиганда [18]. Как показывают наблюдения за единичными молекулами, подвижность EGFR сменяется несколькими разными короткоживущими состояниями: свободным, ограниченным в перемещении и неподвижным. В неподвижном состоянии EGFR имеет тенденцию олигомеризоваться в покрытых клатрином ямках, перекрестное фосфорилирование в которых дополнительно усиливает проходящий сигнал [19]. По-видимому, олигомеры могут быть сопряжены и с другими структурами, обеспечивающими эндоцитоз [20].

Фосфорилирование EGFR и его часто сверхэкспрессированного при ряде видов рака партнера ErbB2 стимулирует такие внутриклеточные регуляторные пути, как RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR, Src-киназы и факторы транскрипции STAT [3]. Эти регуляторные пути можно рассматривать в качестве компонентов сложной регуляторной сети, с большим количеством положительных и отрицательных обратных связей. Сигнальная сеть, на которую оказывает влияние EGFR, насчитывает более 300 компонентов, связанных более чем двумя сотнями реакций [21]. Сигнализация EGFR тонко настраивается в клетках с помощью множества координированных механизмов, включая регуляцию фосфатазами, обратными связями нижележащих звеньев сигнальной цепи, эндоцитозом и внутриклеточным транспортом [21]. Специфичность, направление и величина клеточного ответа определяются экспрессией положительных и отрицательных регуляторов, активирующим лигандом, компонентами димеров рецепторов и набором белков, взаимодействующих с фосфорилированными тирозинами *C*-концевых доменов тирозинкиназных рецепторов.

ПРИРОДНЫЕ ЛИГАНДЫ EGFR

В нормальных клетках активация тирозинкиназной функции EGFR строго регулируется извне достаточно большим набором природных полипептидных лигандов. Эта регуляция концентрационно зависима, сродство EGF к мономерному рецептору существенно выше, чем к димеру, с которым уже связана одна молекула EGF, что может быть интерпретировано как наличие отрицательной кооперативности [22]. Наиболее известным лигандом EGFR является

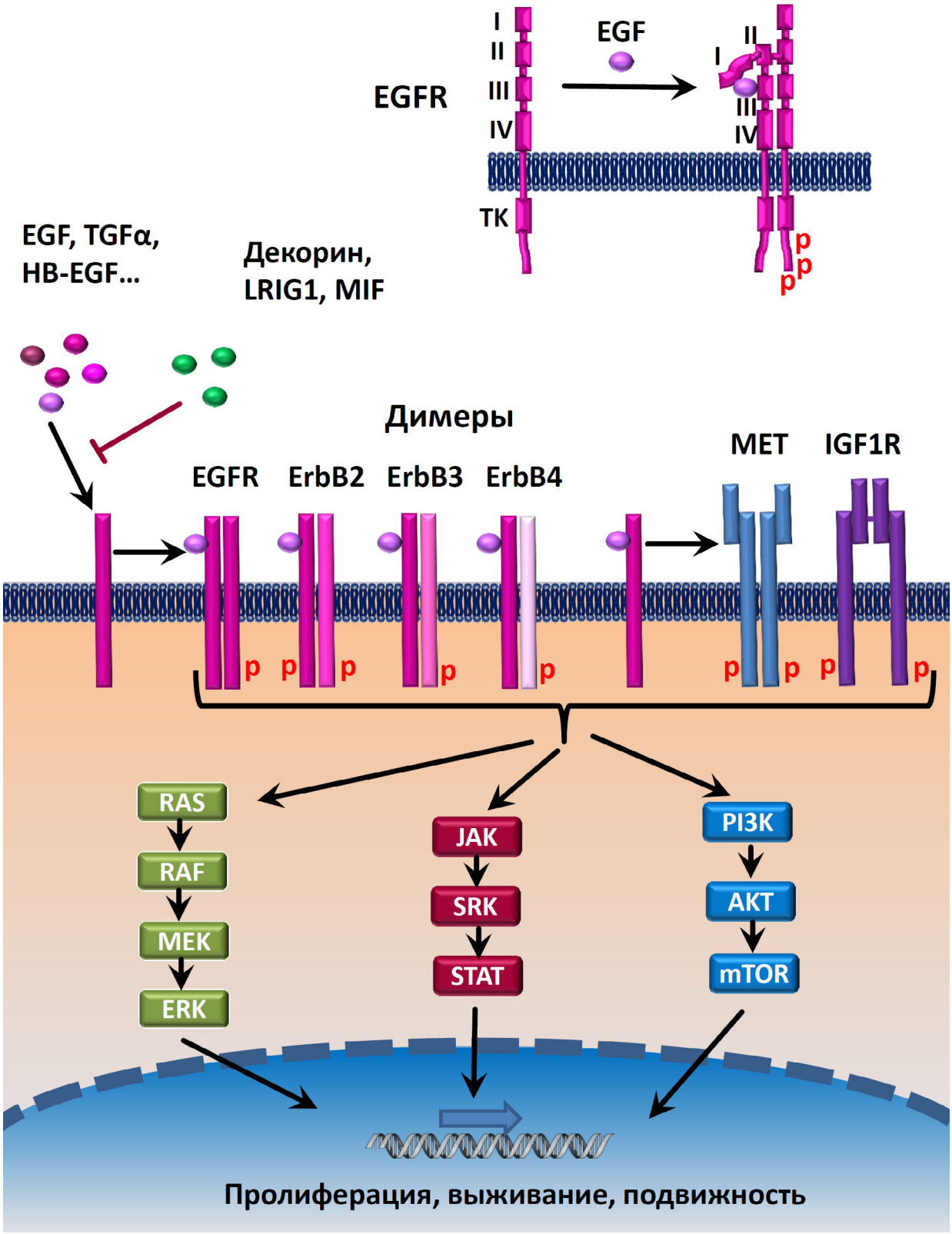


Рис. 1. Принципиальная схема основных сигнальных путей сети, активируемых EGFR. I–IV – внеклеточные домены EGFR, TK – тирозинкиназный домен, P – фосфорилированные тирозины, MET – рецептор фактора мезенхимально-эпителиального перехода, IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

EGF. Другие природные лиганды подобны ему по структуре: основной особенностью этих молекул является наличие трех дисульфидных мостиков, которые определяют жесткую трехмерную структуру белка (EGF-подобный домен). Именно эта трехмерная структура в значительной мере, наряду с конкретными аминокислотными последовательностями, взаимодействующими с I и III внеклеточными доменами, по-видимому, определяет взаимодействие с центром связывания рецептора [23]. Большинство лигандов ErbB рецепторов образуется из больших трансмембранных предшественников, протеолитическое расщепление которых приводит к образованию растворимого фактора роста. В настоящее время известно уже более дюжины природных полипептидов, которые могут с разной эффективностью и результатом взаимодействовать с внеклеточной частью ERGR. EGF, TGFα, амфирегулин связываются с EGFR, тогда как бетацеллюлин, гепарин-связывающий фактор роста и эпирегулин, помимо EGFR, могут также активировать ErbB4 [9]. Недавно было показано, что EGFR активируется путем связывания с ним также одним из ключевых регуляторов ангиогенеза – ангиогенином. Ангиогенин связывается с EGFR с достаточно высоким сродством (~40 нМ) и, кроме этого, обладает также слабой РНКазной активностью, что отражает его другое название – RNase 5 [24, 25]. Два фактора роста, неурегулины 2α и 2β, основными рецепторами которых являются ErbB3 и ErbB4, могут также связываться и активировать EGFR [26, 27]. Кроме агонистов у EGFR имеются также естественные антагонисты. Протеогликан декорин связывается с EGFR с наномолярным сродством [28] и приводит к уменьшению количества рецептора на поверхности клетки за счет кавеолинового эндоцитоза и последующей деградации рецептора [29]. Гомолог декорина – отщепленный растворимый внеклеточный домен LRIG1 (Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1) также способен взаимодействовать с EGFR с наномолярным сродством и конкурировать с EGF за связывание [30]. Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), известный регулятор врожденного иммунитета может блокировать активацию EGFR за счет связывания с внеклеточным доменом рецептора [31].

В последнее время стало ясно, что разные природные лиганды EGFR стабилизируют различающиеся по структуре димеры рецепторов, что приводит к разным физиологическим последствиям [32]. Эпирегулин и эпиген, которые можно рассматривать как частичные агонисты EGFR, индуцируют образование менее стабильных, чем при связывании EGF и TGFα короткоживущих димеров. Тем не менее эта ослабленная димеризация рецепторов приводит к более длительной устойчивой сигнализации, вызывая дифференцировку клеток рака молочной железы и не приводя к пролиферации клеток, как это делает EGF [32]. Природные лиганды EGFR могут различаться также по способности индуцировать образование димеров семейства ErbB, что также может вызывать разные биологические эффекты при активации через EGFR разными лигандами в одной и той же клетке. Радиолигандный анализ показал, что сродство EGF и TGFα к гетеродимерам EGFR/ErbB2 выше, чем сродство к гомодимерам EGFR, в то время как бетацеллюлин и амфирегулин показали одинаковое сродство к обоим димерам. Амфирегулин проявляет свойства частичного агониста, что отражается в более низком уровне фосфорилирования рецепторов, индуцируемого им по сравнению с EGF, TGFα и бетацеллюлином [33]. В отличие от других лигандов, амфирегулин показывает двухфазную кинетику образования димеров, что позволяет предположить, что его путь активации EGFR включает связывание как с мономерами, так и с предсуществующими неактивными димерами. В отличие от него, EGF, TGFα и бетацеллюлин, по-видимому, в основном активируют рецептор через связывание с мономерами рецептора и его димеризацию [33]. Таким образом, отличия в биологическом ответе на различные лиганды EGFR могут быть результатом нескольких процессов: полного или частичного агонизма в отношении образования димеров, различий в кинетическом пути генерации димеров активированных рецепторов и доле образования гетеродимеров ErbB по сравнению с гомодимерами.

Еще один путь регуляции сродства лигандов к EGFR осуществляется путем метилирования внеклеточной части рецептора аргинин-метилтрансферазой (PRMT1), что может обеспечить трехкратное увеличение сродства лигандов к EGFR [34]. Нокдаун PRMT1 или отсутствие соответствующих аргининов (R198 и R200) уменьшают сродство к EGFR как EGF и TGFα [34], так и ангиогенина/RNase 5 [35]. Метилирование этих аргининов, дестабилизирует взаимодействие между II и IV доменами внеклеточной части EGFR, что облегчает взаимодействие лигандов с I и III доменами, вызывает изменение конформации и димеризацию рецепторов. Экзогенная экспрессия PRMT1 повышает сродство лиганда к EGFR и активирует опосредованные рецептором дальнейшие сигнальные события [34].

Имеющаяся к настоящему моменту сумма сведений о связывании факторов роста и других

природных лигандов с EGFR вряд ли в полной мере описывается в терминах изотермы адсорбции Ленгмюра с единственным значением константы диссоциации и количеством мест связывания на клетку, что является усредненной и огрубленной моделью реального процесса. Об этом свидетельствует наличие отрицательной кооперативности, образование димеров с рецепторами-партнерами, уже известные ковалентные модификации, влияющие на связывание, гетерогенность клеток, динамический процесс изменения доступных для связывания рецепторов на поверхности клетки. Более уверенно можно говорить об интервале значений констант диссоциации комплекса лиганд–рецептор, который для EGF находится в диапазоне от долей до единиц наномолей на литр, что для разных объектов может отражать как наличие отрицательной кооперативности, так и добавление влияния какого-то другого фактора. Такими факторами могут быть образование комплекса с рецепторами-партнерами (например, с ErbB2), разная степень метилированности значимых для связывания аргининов, наличие мутаций в части рецепторов. Такие варианты могут быть также описаны через наличие нескольких различающихся по сродству субпопуляций рецепторов.

ЭНДОЦИТОЗ И ДАЛЬНЕЙШИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ

Для EGFR, как и для множества поверхностных клеточных рецепторов, опосредующих ответ на внешние регуляторные сигналы, эндоцитоз служит обычным способом снижения ответа путем отрицательной обратной связи. Дополнительная регуляция обеспечивается сортировкой интернализованного рецептора, который может быть направлен обратно на плазматическую мембрану, на деградацию в лизосомы или в другие клеточные компартменты, в которых он дополнительно регулирует клеточные процессы [36]. В отсутствие лигандов EGFR интернализуется медленно: культуры клеток, экспрессирующих умеренное количество EGFR (<200 000 рецепторов на клетку), показывают $t_{1/2}$ (время полуобновления) в диапазоне 6–10 ч, тогда как в клетках с аномально высокой экспрессией EGFR, таких как эпидермоидная карцинома человека A431 (~ 2 миллиона рецепторов на клетку), $t_{1/2}$ может достигать суток и более. Связывание лиганда и активация тирозинкиназы приводит к быстрому эндоцитозу и многократно увеличивает константу скорости эндоцитоза EGFR [37]. В цитоплазматической части EGFR находятся несколько сигналов интернализации, которые демаскируются при связывании лиганда. К ним относятся два разных мотива распознавания субъединиц адапторного белка 2 (AP2), который связывает мембранные белки с клатриновой решеткой [38]. Некоторые фосфотирозины в цитоплазматическом хвосте EGFR после фосфорилирования также обеспечивают присоединение E3 убиквитин-лигазы Cbl как напрямую [39], так и через еще один адапторный белок Grb2 [40], который связывает фосфорилированный рецептор с E3 убиквитин-лигазой Cbl. Это обеспечивает активацию сигнального каскада RAS/MAPK и эндоцитоз EGFR. Такое дублированное взаимодействие между Cbl и EGFR необходимо для стабильного привлечения Cbl и эффективного убиквитинирования рецепторов [41]. Необходимо отметить, что множественное убиквитинирование является не единственным фактором, влияющим на эндоцитоз EGFR. Даже замена 15 остатков лизина в его киназной части, приводящая к почти полному подавлению убиквитинирования, может не приводить к существенному подавлению интернализации [42]. Клатрин-зависимый эндоцитоз активированного EGFR регулируется несколькими механизмами, функционирующими избыточным и кооперативным образом, включая убиквитинирование киназного домена рецептора и *C*-концевых остатков лизина, а также адапторных белков AP-2 и Grb2 [43]. Сложности регуляции эндоцитоза EGFR добавляет наличие еще одного механизма ковалентной модификации рецептора, помимо убиквитинирования. EGFR также модифицируется убиквитин-подобной молекулой Nedd8 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8) [44]. Эта модификация катализируется Cbl в комплексе с Nedd8-специфической лигазой E2 (Ubc12) и облегчает присоединение остатков убиквитина с помощью Cbl и лигазы UbcH7. Такая сложность и многократное дублирование механизмов, вовлеченных в интернализацию активированного EGFR, делают этот процесс устойчивым к возмущениям (например, мутациям или изменению экспрессии компонентов механизма эндоцитоза) [38]. В частности, для того чтобы существенно подавить клатриновый эндоцитоз EGFR необходимо одновременное предотвращение (например, за счет мутирования) работы мотивов, связывающих AP2, множественного убиквитинирования и ацетилирования EGFR [43]. Возможным объяснением устойчивости процесса эндоцитоза EGFR является также существование дублирующих друг друга клатрин-зависимых и клатрин-независимых процессов. Клетки могут убирать активированный EGFR с

поверхности несколькими разными путями: при помощи клатрин-зависимого, клатрин-независимого, эндофилин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза [45]. Во всех типах клеток, экспрессирующих рецептор, в ответ на добавление лиганда EGFR интернализуется с помощью быстрого клатрин-зависимого эндоцитоза при всех физиологических концентрациях EGF [36]. Заметная часть EGFR, поступающего в клетку таким путем, возвращается обратно на плазматическую мембрану [46], что может осуществляться двумя путями с разным временным интервалом [47]. Клатрин-зависимый эндоцитоз, по-видимому, является насыщаемым, что становится заметным при высокой экспрессии рецептора, и при более высоких концентрациях добавленного EGF (> 2 нМ) во многих типах клеток подключаются более медленные клатрин-независимые виды эндоцитоза [36]. Кроме того, при достаточно высоких концентрациях лиганда, превышающих в несколько раз значение константы диссоциации комплекса лиганд–рецептор, на эндоцитозе начинает сказываться и насыщение рецептора лигандом. Это делает дальнейшее увеличение концентрации лиганда малоэффективным с точки зрения его транспорта в клетку при помощи рецептор-опосредуемого эндоцитоза.

Кроме клатрин-зависимого эндоцитоза существует также быстрый эндофилин-зависимый эндоцитоз, который активен, по-видимому, на переднем крае мигрирующей клетки, и необходим для пространственно ограниченной EGF-зависимой передачи сигналов [45]. Данный вариант поглощения EGFR опосредуется CBL, адапторным белком CIN85 и зависит, как и клатрин-зависимый эндоцитоз, от наличия динамина [45, 48].

Тип эндоцитоза EGFR может также зависеть и от лиганда, связавшегося с рецептором. Так, например активация EGFR в результате связывания EGF или TGFα, приводила в клетках HeLa только к клатрин-зависимому эндоцитозу, тогда как гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF) и бетацеллюлин стимулировали как клатрин-опосредованные, так и клатрин-независимые варианты поглощения [49]. Поглощение EGFR может осуществляться и с помощью макропиноцитоза, что наблюдается в ответ на стимуляцию EGF в клетках A431 [50, 51], или через формирующиеся из дорзальных складок клеточной мембраны везикулярно-трубчатые структуры, образование которых зависит от динамина и фосфоинозитид киназы PI3, происходящих из дорсальных складок плазматической мембраны [51, 52]. Необходимо отметить, что для клатрин-независимого эндоцитоза необходимо убиквитинирование EGFR, поскольку мутации, препятствующие присоединению убиквитина, ингибируют и эндоцитоз [41]. Этот вариант эндоцитоза EGFR зависит от обогащенных холестерином доменов плазматической мембраны, но не зависит от кавеолина [36].

Независимо от пути интернализации EGFR поступает в ранние эндосомы, где происходит их сортировка для регуляции ответа на связывание лиганда с EGFR. Пути дальнейшего транспорта EGFR оказывают существенное влияние на регуляторные процессы в клетке, способствуя сбалансированности ответа на поступивший сигнал, что подробно рассмотрено в нескольких обзорах [36, 53]. Как уже было отмечено, двумя основными направлениями транспорта EGFR являются путь в лизосомы для деградации EGFR, что приводит к снижению ответа на стимуляцию рецептора, и его возвращение обратно на плазматическую мембрану для продолжения ответа на поступивший сигнал. Однако некоторая небольшая часть рецепторов через COP1-зависимый везикулярный транспорт попадает из эндосом в эндоплазматический ретикулум (ЭР) [54]. Кроме этого, известны и дополнительные варианты транспорта EGFR в ядро (обсуждается ниже) и митохондрии. Транспорт активированного EGFR в митохондрии зависит от c-Src и может приводить к фосфорилированию субъединицы COXII цитохром *c*-оксидазы в клетках рака молочной железы, что было показано при помощи добавления c-Src и EGFR к иммунопреципитатам COXII или к очищенному фрагменту COXII [55]. Такое перемещение EGFR увеличивает устойчивость клеток к апоптозу [56]. Обнаружено также, что транспорт EGFR в митохондрии клеток немелкоклеточного рака легких приводит к увеличению инвазивности и появлению метастазов [57, 58]. Однако доля рецептора, оказывающегося в митохондриях, крайне невелика, ~2% фосфорилированного EGFR оказываются в митохондриях [57].

ТРАНСПОРТ EGFR В ЯДРО

Внутриклеточная примембранная часть EGFR содержит трехчастный сигнал ядерной локализации (RRRHIVRKRTLRR), который опосредует появление небольшой доли полноразмерного рецептора в ядре клетки после активации рецептора [59]. Похожие трехчастные сигналы есть и в остальных ErbB. Транспорт EGFR от плазматической мембраны в ядро не является систематическим постоянным ответом на связывание лиганда с рецептором, но, ско-

рее, наблюдается в определенных тканях или при определенных условиях [60]. Этот транспорт происходит в результате эндоцитоза и требует импортина β1, что указывает на прохождение через ядерную пору [61]. Процесс нахождения EGFR в ядре является контролируемым, на что указывает и наличие у EGFR функционального сигнала ядерного экспорта [61]. EGFR транспортируется в ядро в комплексе с EGF [62] и обнаруживается как в нуклеоплазме, так и во внутренней ядерной мембране [63]. Лиганды EGFR по-разному влияют на возможность этого транспорта: так, добавление EGF, TGFα, HB-EGF и бетацеллюлина приводило к дозозависимому накоплению EGFR в ядрах клеток аденокарциномы печени человека, тогда как амфирегулин и эпирегулин не оказывали такого действия [64]. Механизмы, приводящие к ядерному накоплению рецептора, остаются не до конца ясными до настоящего момента, возможно, что EGFR оказывается в ядре несколькими путями [60, 63, 65, 66]. Из эндосом рецепторы могут попадать в ЭР и выходить в цитозоль при помощи ретроградного транспорта через транслокон Sec61, который обеспечивает как транспорт вновь синтезируемых белков в ЭР, так и перемещение неправильно свернутых белков обратно в цитозоль. Несколько исследований показали, что EGFR взаимодействует с Sec61β, одной из трех субъединиц транслокона [67, 68]. Однако, где происходит перемещение EGFR через этот транслокон, почему этому не мешает гликозилированность рецептора и каким образом в ядре он оказывается в комплексе с лигандом, неизвестно. Непонятно также, что обеспечивает растворимость EGFR в нуклеоплазме. Среди предлагаемых путей транспорта EGFR в ядро отмечают выход его в цитозоль из ЭР с последующим транспортом через ядерную пору и транспорт в виде интегрального белка до наружной оболочки ядра и далее через периферические каналы ядерной поры. Возможен также прямой транспорт некоторой фракции эндосом к ядру с последующим слиянием с ядерной оболочкой и транспортом через ядерную пору на внутреннюю мембрану ядра [69]. Поскольку Sec61 был обнаружен во внутренней мембране ядерной оболочки, возможно, EGFR проникает в ядро непосредственно из нее [67].

Внутри ядра EGFR может взаимодействовать с транскрипционными факторами STAT3, STAT5, E2F1, фосфорилировать ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), обеспечивая ускорение пролиферации и репарационных процессов, и увеличивать радиорезистентность клеток. Благодаря этому ядерный EGFR участвует в пролиферации, опухолегенезе, метастазировании, репарации ДНК, а также обеспечивает устойчивость к повреждающему ДНК излучению и алкилирующим противораковым агентам [63].

ЭКСПРЕССИЯ EGFR ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Активация EGFR при малигнизации может быть вызвана повышенным содержанием рецепторов, увеличенной аутокринной или паракринной продукцией активирующего фактора роста и изменением собственной тирозинкиназной активности в результате мутаций. Часто причиной активации EGFR является сочетание сразу нескольких факторов, что усложняет поиск лечения.

Одной из наиболее частых причин активации EGFR является увеличение его экспрессии. Причиной этого может быть не только амплификация гена, но и усиление его транскрипции, трансляции, уменьшение деградации рецептора и изменение в экспрессии некодирующих РНК [70–72]. Приводимые в разных работах оценки экспрессии EGFR для разных онкологических заболеваний сильно варьируют, что зависит от стадии заболевания, использованной ранее терапии, популяции, метода исследования (определение мРНК, иммуногистохимия), оцениваемого параметра, используемых антител, времени хранения препаратов. В некоторых случаях было обнаружено достаточно большое увеличение экспрессии EGFR. Так, при раке головы и шеи содержание мРНК EGFR увеличивается в среднем в 69 раз по сравнению с нормальной тканью [73]. Прямого однозначного соответствия между мРНК и экспрессией белка исследования не выявляют, а иммуногистохимическое выявление экспрессии не является строго количественным, и кроме того, подвержено влиянию многих не всегда учитываемых факторов [74]. В тех случаях, когда в исследованиях использовали несколько методов, иммуногистохимическое окрашивание показывает меньшую частоту встречаемости сверхэкспрессии EGFR по сравнению с увеличением уровня мРНК. Так, выявляемая сверхэкспрессия, по данным иммуногистохимических исследований, при колоректальном раке составляла 61%, по анализу мРНК – 79% и при выявлении одним из двух способов – 82% [75]. В одном и том же исследовании образцов немелкоклеточного рака легкого в зависимости от выбранных коммерческих антител сверхэкспрессия EGFR варьировала в диапазоне 5–56% [76]. Тем не ме-

нее именно этот вариант оценки экспрессии EGFR позволяет получить данные по содержанию рецептора, суммирующие изменения транскрипции, трансляции и деградации белка. Чаще всего при этом в зависимости от интенсивности окраски препараты распределяют по нескольким группам (обычно четырем), относя к повышенной экспрессии одну или две группы с наиболее выраженной экспрессией рецептора. Анализ большого числа проведенных исследований позволяет выявить те онкологические заболевания, при которых увеличение экспрессии EGFR является существенным (табл. 1). Все экспериментальные работы, цитированные в таблице, были проведены с использованием иммуногистохимии, для полноты картины приведены данные из предыдущих обзоров, в части которых цитированы работы как проведенные с использованием иммуногистохимии, так и с использованием других методов. Необходимо также отметить, что эти данные трудно соотносимы с получаемыми при работе на клеточных культурах величинами количества рецепторов на клетку и соответствуют изменениям относительно содержания рецептора в той же нормальной ткани. В ряде случаев (рак мочевого пузыря, глиомы, рак головы и шеи, рак легкого) это дает основания для разработки местных таргетных методов терапии с использованием радионуклидов, фотосенсибилизаторов, нано-

Таблица 1. Частота увеличенной экспрессии EGFR при онкологических заболеваниях

Заболевание	Процент опухолей со сверхэкспрессией EGFR	Источник
Рак головы и шеи	80–100	обзор [79]
	38–92	обзор [80]
	46, 68, 56–85, 49, 68	[81], [82], [83], [84], [85]
Рак шейки матки	70–90	обзор [86]
	30–98	обзор [87]
	18–87	обзор [88][а]
	76–79	[89]
Мезотелиома	44–97	обзор [70]
Рак толстой кишки	25–77	обзор [79]
	61, 53, 39, 62	[75], [90], [91], [92]
Рак поджелудочной железы	30–89	обзор [93]
	30–95	обзор [94]
	40–70	обзор [95]
	42–64	[96]
Немелкоклеточный рак легкого	40–80	обзор [79]
	32–100	обзор [76][б]
	56	[76][в]
Рак молочной железы	14–91	обзор [79]
	2–60	обзор [97][г]
Рак яичников	35–70	обзор [79]
	9–62	обзор [98]
	46–64, 57	[99], [100]
Глиома	40–63	обзор [79]
	68, 65	[101], [102]
Рак мочевого пузыря	31–48	обзор [79]
	27, 74, 71	[103], [104], [105]
Нейроэндокринные опухоли	42–100	обзор [106][д]
	28–57, 87	[107], [108]

[а] – Средневзвешенное – 48,5% по 20 работам с использованием иммуногистохимии и 1823 пациентам; [б] – средневзвешенное – 49,8% по 15 исследованиям и 2399 пациентам с одинаковыми mAb; [в] – 71% – плоскоклеточный рак, 48% – аденокарцинома; [г] – средневзвешенное 21,4% по 36 иммуногистохимическим исследованиям и 12 066 пациентам; [д] – тимома, средневзвешенное – 70,5%, по 8 иммуногистохимическим исследованиям и 227 пациентам.

частиц, реагирующих на различные типы излучения.

В целом, повышенная экспрессия EGFR является одним из наиболее частых событий, регистрируемых при онкологических заболеваниях. Так, при анализе опухолей с неизвестным первичным происхождением экспрессия EGFR была обнаружена в 55% случаев, причем амплификация его гена (17%) оказалась наиболее частым событием среди всех проанализированных маркеров [77].

Гетерогенность тех изменений, которые приводят к онкологическим заболеваниям, приводит к тому, что при одной и той же локализации опухоли возникают принципиально разные варианты заболеваний. При подробной генетической характеристике выявляются подтипы рака в рамках одной локализации, в которых с очень высокой вероятностью наблюдаются одни и те же изменения в ключевых регуляторных белках, к которым относится и EGFR. Так, например сверхэкспрессия EGFR выявляется в 97% случаев «классической» формы мультиформной глиобластомы [78].

УСПЕХИ И ОГРАНИЧЕНИЯ НАПРАВЛЕННОЙ БЛОКИРОВКИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ EGFR

Контролируя один из наиболее часто работающих «входов» сигнальной сети, опосредующей регуляцию деления клеток, EGFR является значимым маркером малигнизации. Более важно, что во многих случаях состояние или экспрессия этого рецептора является одним из необходимых звеньев злокачественного перерождения клеток. Нарушение активации EGFR часто дает постоянный пролиферативный сигнал, без прерывания которого деление клеток становится постоянным. Нужно отметить, что повышенная экспрессия EGFR в солидных опухолях часто ассоциируется с увеличенной продукцией соответствующих лигандов, что приводит к хронической активации рецептора. Естественным решением этой проблемы является прерывание активации EGFR, что может быть достигнуто как блокированием связывания активирующего лиганда, так и ингибированием тирозинкиназной активности. Первый вариант эффективен при повышенной экспрессии EGFR, второй – при перманентной активации рецептора за счет мутаций, в особенности, при подборе специфичного при данной мутации ингибитора.

Моноклональные антитела к EGFR. На востребованность прерывания взаимодействия между лигандами и EGFR указывает большое количество разнообразных искусственных полипептидов, способных к связыванию с внеклеточными доменами EGFR: к настоящему времени их насчитывается ~40 [109]. Они включают в себя химерные антитела, фрагменты антител, однодоменные антитела, антителомимиетики, сконструированные на основе различных каркасных белков: DARPin на основе анкириновых повторов, аффибоди на основе Z-домена белка A, аднектинов на основе 10-го домена фибронектина III типа. Вариантами, успешно дошедшими до широкого терапевтического применения, являются такие моноклональные антитела, как цетуксимаб (Эрбитукс), панитумумаб (Вектибикс), нимотузумаб (Тералок), нецитумумаб (Портразза) (табл. 2). Эти антитела связываются с доменом III внеклеточной части EGFR, не позволяя природным лигандам – факторам роста – активировать рецептор. Цетуксимаб является производным высокоаффинного моноклонального мышиного антитела C225, слитого с константной частью IgG1 человека [110]. Изотип IgG1 обусловливает также способность цетуксимаба вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность, в отличие от панитумумаба, привлекая NK-клетки для уничтожения раковых клеток [111]. К преимуществам панитумумаба, относится то, что он полностью основан на IgG человека, и поэтому его применение менее подвержено появлению аллергических реакций и анафилаксии [112]. Эти два первых терапевтических моноклональных антитела начали широко применяться в клинической практике начиная с середины 2000-х гг. В 2015 г. к ним добавилось еще одно моноклональное человеческое антитело – нецитимумаб [113], которое применяют для лечения плоскоклеточной немелкоклеточной карциномы легких. Его отличает существенно большее, чем у цетуксимаба и панитумумаба, время полувыведения (~ 2 недели). Еще одно терапевтическое моноклональное антитело – нимотузумаб, представляющее собой гуманизированное мышиное антитело, отличают менее выраженные, чем при применении остальных терапевтических антител, побочные эффекты [114]. Это объясняют оптимальным для лечения сродством к EGFR, что позволяет оказывать эффект в основном на клетки со средней и большой экспрессией рецептора и мало затрагивает клетки с небольшим количеством EGFR [115, 116]. Еще ряд моноклональных антител, ингибирующих EGFR, прошел несколько стадий клинических испытаний, но не получил разрешения для широкого клинического применения в силу отсутствия выраженного улучшения от лечения по сравнению с уже применяемыми вариантами терапии. К ним отно-

Таблица 2. Антитела к EGFR, применяемые в клинической практике

Название	K_d	Тип	Тип рака
Цетуксимаб	0,1 нМ	химерное, C225 мыши и IgG1 человека	колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого
Панитумумаб	0,05 нМ	IgG2 человека	колоректальный рак, рак молочной железы
Нимотузумаб	1 нМ	IgG1, гуманизированное	плоскоклеточный рак головы и шеи, назофарингеальная карцинома, глиома, рак поджелудочной железы
Нецитумумаб	0,3 нМ	IgG1 человека	немелкоклеточный рак легкого

сятся гуманизированные IgG1 матузумаб и имгатузумаб, человеческие залутумумаб и долиготузумаб, который взаимодействует и с EGFR, и с ErbB3 [109].

Большая часть применяемых в настоящее время и разрабатываемых блокаторов связывания EGFR обладает двумя механизмами действия: ингибированием пролиферативного сигнального пути и антителозависимой цитотоксичностью. Однако цитотоксический компонент действия этих антител не способен обеспечить достаточный противоопухолевый эффект. Появление же активирующих мутаций в расположенных ниже по сигнальной цепи звеньях, как правило, сводит на нет блокирование сигнала, поступающего от рецептора. Наиболее известным примером таких мутаций являются активирующие мутации KRAS. Опухоли, в которых детектируется дикий тип KRAS, чувствительны к блокированию антителами, тогда как, например, мутации в кодонах 12 и 13 экзона 2 гена *KRAS* приводят к стабилизации функционально активного комплекса RAS-GTP и непрерывной передаче сигнала по MAPK-пути, и действие антител на опухоли с таким измененным *KRAS* не проявляется. Такие мутации встречаются в 40–45% случаев колоректального рака и в 15–30% случаев немелкоклеточного рака легких [117]. Активирующие мутации не ограничиваются *KRAS,* причиной устойчивости опухолей к блокирующей EGFR терапии могут быть также изменения в генах *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN* и других [118], а также экспрессия некодирующих РНК [119]. Кроме того, после первоначального ответа на лечение антителами к EGFR неизменно возникает вторичная резистентность, причиной которой могут быть как мутации *KRAS* [120], так и других генов [121].

Ингибиторы тирозинкиназной активности EGFR. После раскрытия деталей активации EGFR в результате связывания факторов роста огромные усилия были приложены для разработки и испытания ингибиторов фосфорилирования EGFR. В практику лечения ряда онкологических заболеваний (табл. 3) вошли такие ингибиторы, как гефитиниб (Иресса), эрлотиниб (Тарцева), лапатиниб (Тайверб), афатиниб (Товок), осимертиниб (Тагриссо), бригатиниб (Алунбриг) и дакомитиниб (Визимпро) [122], а также икотиниб (Конмана) [123]. Применение пероральных ингибиторов первого поколения (гефитиниб и эрлотиниб) при немелкоколеточном раке легкого (плоскоклеточный рак и аденокарцинома) показало значительно большую эффективность лечения по сравнению с традиционной химиотерапией [124]. Наиболее распространенными мутациями EGFR являются делеции 746–750 в экзоне 19 или точечная мутация с заменой лейцина на аргинин L858R [125]. Пациенты с активирующими мутациями EGFR оказались достаточно чувствительны к обратимым ингибиторам первого поколения, которые имеют во много раз большее сродство к этим мутантным формам рецептора по сравнению с нормальным EGFR. Несмотря на то, что эти ингибиторы оказались эффективными в качестве начальной терапии, они не действуют на сочетание вышеупомянутых мутаций, а также на ряд других, прежде всего, T790M [126]. Это стимулировало продвижение в практику необратимых ингибиторов второго поколения с более широким воздействием на другие рецепторы семейства ErbB, таких как афатиниб и дакомитиниб, призванных преодолеть нечувствительность EGFR с мутацией T790M к эрлотинибу и гефитинибу. Такой вариант оказался не более успешным, чем ингибиторы первого поколения, из-за невозможности достичь достаточной величины терапевтического воздействия в силу их токсичности для нормальных тканей [127]. Значительно успешнее в лечении немелкоклеточного рака легкого оказался более селективный осимертиниб [128, 129]. Несмотря на заметное увеличение продолжительности периода без прогресса

Таблица 3. Ингибиторы тирозинкинзы EGFR, применяемые в медицинской практике

Название	Мишень	Тип	Заболевание
Гефитиниб	EGFR, del 746–750, L858R	обратимый	немелкоклеточный рак легких
Эрлотиниб	EGFR, del 746–750, L858R	обратимый	немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы
Икотиниб	EGFR, del 746–750, L858R	обратимый	немелкоклеточный рак легких
Бригатиниб	EGFR, C797S, ALK*	обратимый	немелкоклеточный рак легких
Лапатиниб	EGFR, ErbB2	необратимый	рак молочной железы
Афатиниб	EGFR, ErbB2	необратимый	немелкоклеточный рак легких
Осимертиниб	EGFR, del 746–750, L858R, T970M, ins 20	необратимый	немелкоклеточный рак легких
Дакомитиниб	EGFR, del 19, L858R, HER2, EGFR, HER4, AKT, ERK	необратимый	немелкоклеточный рак легких

* ALK – киназа анапластической лимфомы.

заболевания, постепенное развитие резистентности к лечению требует как применения сочетания разных ингибиторов, так и поиска дальнейших более эффективных средств воздействия. Возникающие мутации в локусе C797, по которому осимертиниб присоединяется к EGFR, приводят к появлению устойчивых вариантов опухолей [130].

В основном успехи в применении ингибиторов тирозинкиназной активности EGFR относятся к немелкоклеточному раку легкого. Для данного варианта рака легких характерна как сверхэкспрессия EGFR (примерно в половине случаев), так и мутации, приводящие к перманентной активации рецептора [127]. Подбор комбинаций ингибиторов тирозинкиназ на основании разной чувствительности мутантных форм EGFR к разным ингибиторам [131, 132] с добавлением блокирующих антител могут, по-видимому, улучшать результаты терапии [127]. Таким образом, разработка панели ингибиторов EGFR стала ярким примером персонализованного подхода к лечению рака, опирающегося на данные о строении и мутациях одного из ключевых звеньев развития злокачественного процесса.

Общими ограничениями направленной на блокирование EGFR терапии являются необходимость перманентного применения терапевтических средств и недостаточная эрадикация раковых клеток. Длительность применения ингибиторов и наличие большого количества опухолевых клеток приводят к появлению резистентных к терапии вариантов и последующей клональной селекции наиболее устойчивых из них [127]. Снятия ингибирования апоптоза в результате перманентной активации Ras/Raf/MEK/ERK через EGFR [133] оказывается недостаточно для радикального уничтожения опухолей. Возникающая резистентность опухолей обусловлена, помимо мутаций в гене *EGFR*, также другими нарушениями в сигнальной сети, регулирующей пролиферацию. Такие нарушения включают в себя активирующие мутации KRAS, BRAF, каталитической субъединицы фосфатидилинозитол-4-5-бифосфат киназы (PIK3CA), слияние генов, затрагивающее активацию *RET*, *FGFR3* и *BRAF*, амплификацию *MET*, *FGFR*, *ErbB2* и другие [134–139], а также экспрессию длинных некодирующих РНК, например UCA1 (urothelial cancer-associated 1) [140]. В ряде случаев лечение ингибиторами приводит к изменению типа заболевания, переходу от немелкоклеточного к мелкоклеточному раку легкого [141].

Таким образом, направленная или таргетная терапия, достаточно хорошо развитым примером которой являются подходы, направленные на EGFR, сталкивается с той же проблемой появления устойчивости опухоли, что и традиционная химиотерапия. Как уже было описано выше, одним из решений этой проблемы может служить подбор набора ингибиторов активированного сигнального пути, включающий не только ингибиторы EGFR, но и ингибиторы нижележащих звеньев – KRAS, BRAF и других. Быстрое развитие методов жидкостной биопсии [142] и современных методов секвенирования – NGS (new generation sequencing) [143] делают эту проблему технически решаемой. Тем не менее высокая гетерогенность, генетическая нестабильность и клональная эволюция опухолей [144–146] не позволяют рассчитывать на безус-

ловный успех такого подхода. Блокировка пролиферативного сигнала замедляет рост опухоли, но не приводит к ее исчезновению. Добавление к лечению токсических химиотерапевтических средств далеко не во всех случаях способно привести к излечению. Поэтому во многих лабораториях большое внимание уделяется развитию другого решения проблемы устойчивости онкологических заболеваний к терапии – использованию направленного подхода не для ингибирования патологически измененных звеньев нормальных регуляторных процессов, а для селективного уничтожения раковых клеток. Многочисленные варианты различных онкологических заболеваний с повышенной экспрессией EGFR являются перспективными кандидатами на разработку такого подхода.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ EGFR В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ

Традиционно для терапии онкологических заболеваний чаще всего применяется химиотерапия, действующая в первую очередь на быстро делящиеся клетки, и радиотерапия, которая в большей мере воздействует на ДНК и также сильнее воздействует на делящиеся клетки. И то, и другое воздействие не являются селективными по отношению к собственно раковым клеткам, что приводит к появлению тяжелых побочных эффектов, делающих затруднительным излечение. Кроме этих основных методов для противораковой терапии разрабатываются и в некоторых случаях используются также фотодинамическая терапия (ФДТ) и генотерапия. Все эти варианты терапевтических воздействий могут быть соединены с таргетной терапией не только в виде сочетания одновременного или последовательного применения, но и для направленной доставки соответствующего терапевтического начала (токсического химиотерапевтического вещества, источника ионизирующего излучения, фотосенсибилизатора (ФС) или необходимого гена) в опухолевые клетки-мишени. EGFR в силу прямой вовлеченности в активацию деления клеток, эндоцитируемости и частой повышенной экспрессией при многих онкологических заболеваниях представляется одним из самых привлекательных объектов для создания направленной противоопухолевой терапии.

Как уже было отмечено в разделе «Эндоцитоз и дальнейший внутриклеточный транспорт», стимуляция внеклеточными сигнальными лигандами увеличивает скорость интернализации EGFR на порядки. Этот процесс зависит от димеризации рецептора и его автофосфорилирования. Антитела к EGFR блокируют этот процесс, однако по крайней мере некоторые из них способны относительно эффективно поступать в клетки. Так, mAb 225, вариабельная часть которого обеспечивает функциональность цетуксимаба, эндоцитируется со скоростью в 6–7 раз меньшей скорости эндоцитоза EGF [147], что тем не менее существенно превышает поступление EGFR без лиганда в клетку. Как показывают эксперименты, проведенные на клетках аденокарциномы легкого A549 с умеренной экспрессией EGFR (~10^5 рецепторов на клетку), больше половины поглощенного mAb и EGFR в течение первого часа возвращаются обратно на поверхность, в отличие от рецептора в комплексе с EGF, более 70% которого остается внутри клетки и деградирует в лизосомах. Интересно, что цетуксимаб способен обеспечивать транспорт некоторой части EGFR в ЭР, где он обнаруживается в комплексе с Sec61, и далее в ядро клетки [148]. Такой транспорт зависит от связывания антител в сайте связывания лигандов и поливалентности связывания антитела, поскольку он не был обнаружен для блокирующего антитела к другому участку рецептора и Fab′-фрагментов цетуксимаба [148]. Для эндоцитоза как цетуксимаба, так и наночастиц, покрытых им, требуется кластеризация комплексов лиганд–рецептор на клеточной поверхности в гликосфинголипидных доменах, после чего следует кавеолин- и динамин-2-зависимый эндоцитоз [149]. Кластеризация цетуксимаб-рецепторных комплексов в качестве промежуточного шага в процессе инициирования эндоцитоза была также обнаружена при помощи анализа движения единичных частиц на поверхности клетки [150]. Вышеизложенное объясняет большой интерес к цетуксимабу в качестве лиганда для доставки цитотоксических агентов в раковые клетки-мишени. Перспективным вариантом лигандов считаются искусственные антителоподобные каркасные белки, позволяющие позиционировать в пространстве набор остатков, обеспечивающих взаимодействие с целевой молекулой. К ним относятся аффибоди, создаваемые на основе белка A, которые отличаются небольшим размером [151]. Несколько аффибоди эффективно взаимодействуют с EGFR, но скорость их эндоцитоза также невелика [152]. Существует также используемый для создания различных систем доставки противораковых средств короткий пептид GE11, способный связываться с EGFR, обеспечивающий интернализацию модифицированных им наночастиц [153]. Среди искусственных лигандов, способных связываться с EGFR, помимо антител и пептидов, есть и аптамеры. РНК-аптамер E07 оказался способным

связываться с EGFR с наномолярным сродством, и около четверти связанного с поверхностью аптамера было способно интернализоваться клетками за 30 минут [154].

Наночастицы. Наночастицы представляют собой крайне гетерогенный по свойствам класс объектов, размер которых позволяет присоединять к ним (или нагружать в них) большое количество низкомолекулярных противоопухолевых агентов, например традиционных химиотерапевтических средств. Уже только такое объединение может существенно изменять распределение и фармакокинетику веществ. В отношении онкологических заболеваний присоединение противоопухолевых агентов к наночастицам производится в расчете на эффект повышенной проницаемости и удержания (enhanced permeability and retention, EPR) [155]. На использование этого эффекта, причиной которого является наличие значительного числа больших пор в местах быстрого и хаотичного роста сосудов в опухоли, возлагали большие надежды в использовании наночастиц для противоопухолевой терапии. Однако клинические исследования показали, что, в отличие от экспериментальных опухолей у мышей, в опухолях человека EPR менее выражен и может сильно различаться не только между опухолями одного типа у разных пациентов, но и между разными метастазами одного пациента [156]. Среди вариантов преодоления нестабильности эффекта наночастиц рассматривается и придание им функционального адреса, в частности присоединение лиганда к EGFR [157, 158].

Типичным вариантом реализации такого подхода и единственным дошедшим пока до стадии клинической проверки являются иммунолипосомы, нагруженные одним из наиболее распространенных противораковых лекарств – доксорубицином. С целью обеспечения устойчивости в крови такие липосомы несут остатки полиэтиленгликоля (ПЭГ), а для придания специфичности по отношению к раковым клеткам со сверхэкспрессией EGFR – Fab′-фрагмент цетуксимаба [159]. Такие липосомы, названные авторами anti-EGFR ILs-dox, содержат в среднем по 4000 молекул доксорубицина, лучше переносятся пациентами, чем те же дозы свободного доксорубицина и не показывают побочных эффектов, связанных с блокированием EGFR. В настоящее время этот вариант направленной доставки доксорубицина в клетки с повышенной экспрессией EGFR при лечении трижды негативного рака молочной железы находится на второй стадии клинических испытаний. В экспериментах на животных введение такого рода липосом с Fab′-фрагментами цетуксимаба способно в 6 раз увеличивать накопление лекарства в ксенографтах рака молочной железы MDA-MB-468 [160].

Целый ряд похожих систем доставки, использующих химиотерапевтические средства, упакованные в липосомы, которые модифицируют лигандами к EGFR, находится на стадии доклинических исследований (рис. 2). К ним относятся иммунолипосомы с доксорубицином и цетуксимабом, присоединенным через фолат-связывающий белок [161], с бор-содержащим анионом для нейтрон-захватной терапии, а также с холестерин-цетуксимабом [162], цисплатином и нимотузумабом [163], 5-фторурацилом и цетуксимабом [164], липосомы с ФС фталоцианином цинка и однодоменными антителами к EGFR EGa1 [165], липосомы с оксалиплатином и EGF [166], цисплатином и mAb к EGFR [167], липосомы с гемцитабином с присоединенными ПЭГ и mAb к EGFR [168]. Необходимо отметить, что такие подходы с направленной доставкой противораковых средств показали возможность преодоления множественной лекарственной устойчивости, что часто является проблемой при терапии рака [160].

Все перечисленные варианты могут оказаться полезными для клиники, однако поиск оптимального лекарства, лиганда и способа присоединения продолжает интенсивно развиваться. Так, для получения однородного присоединения к липосомам использовали сортазу, соединяющую пептидные цепи по специфической последовательности LPETG на *C*-конце с пентаглицином на *N*-конце [169]. Другим направлением совершенствования противораковых средств является применение нескольких цитотоксических агентов, загруженных в иммунолипосомы. Для реализации этого подхода были исследованы иммунолипосомы с доксорубицином и винорелбином с новыми однодоменными scFv EGFR-s10 [170]. Еще одним вариантом использования сочетанного воздействия являются иммунолипосомы с цетуксимабом, несущие доксорубицин и β-излучатель ^{188}Re в качестве потенциального тераностического средства [171]. Общим направлением поиска лучших противораковых лекарств является разработка многофункциональных систем доставки лекарственных средств. В применении липосомных вариантов доставки это реализуется, в частности в виде так называемых функционализованных липосом. Одним из вариантов подхода являются термочувствительные липосомы с доксорубицином и пептидом GE11 [172]. Эти липосомы, стабильные при температуре тела, при повышении температуры становятся неустойчивыми и высвобождают лекарство при 40 °C, что при необхо-

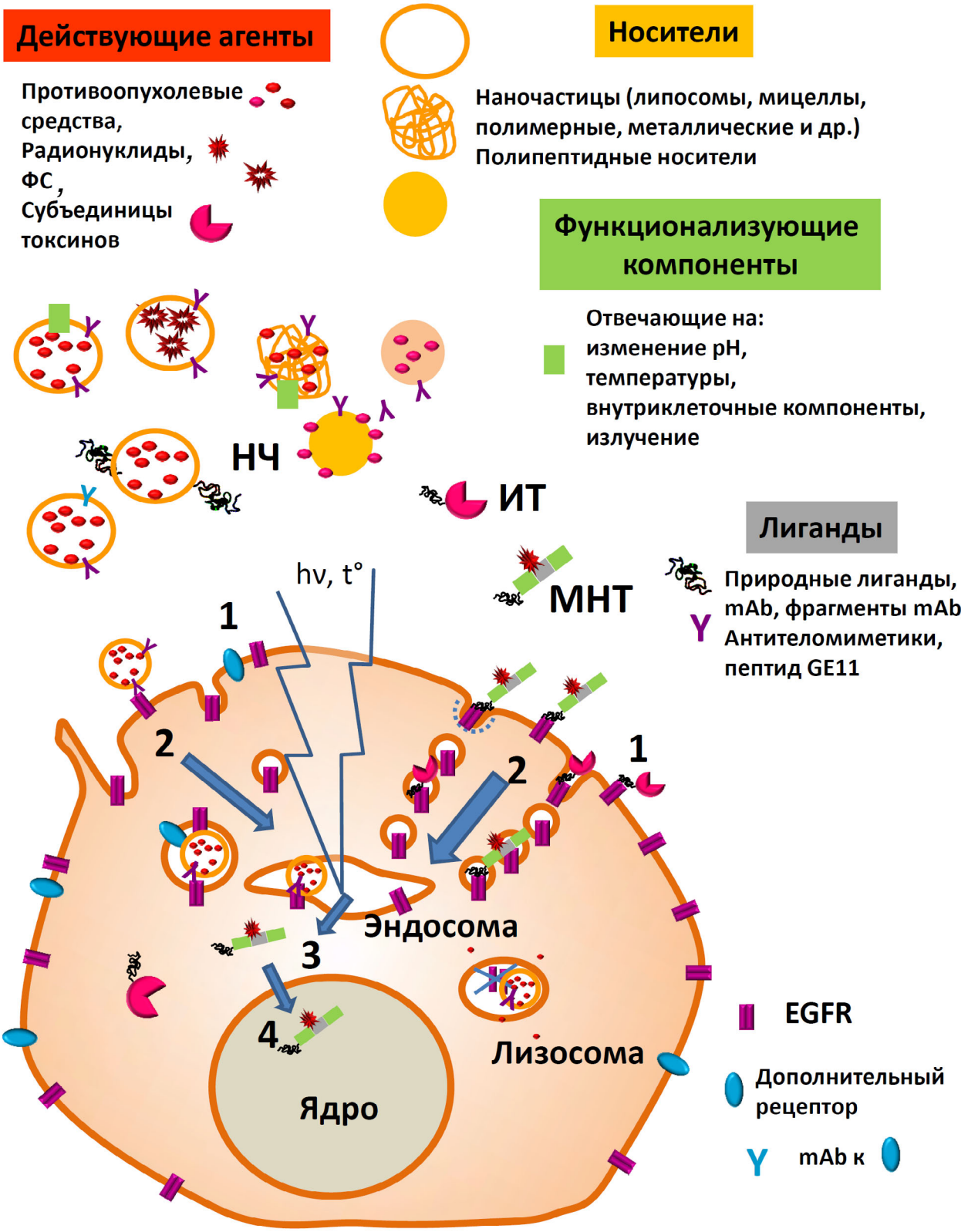


Рис. 2. Схема основных разрабатываемых подходов для направленной доставки терапевтических агентов в клетки через EGFR. 1 – Связывание с рецептором, 2 – эндоцитоз: макропиноцитоз, фагоцитоз, кавеолиновый, быстрые клатрин-зависимый, эндофилин-зависимый варианты эндоцитоза, 3 – выход из эндосом, 4 – транспорт в ядро. Сокращения: ФС – фотосенсибилизаторы, НК – нуклеиновые кислоты, НЧ – наночастицы, ИТ – иммунотоксины, МНТ – модульные нанотранспортеры

димости может обеспечить дополнительную селективность воздействия за счет локального нагрева. Чувствительность к pH окружения является другим вариантом реализации дополнительных функций: иммунолипосомы с mAb к EGFR начинают высвобождать гемцитабин при понижении pH [173], что может быть реализовано как в эндосомах, так и в закисленной части внеклеточного пространства ряда опухолей.

Еще одним вариантом наночастиц для направленной доставки противораковых лекарств в клетки с использованием EGFR являются мицеллы. Мицеллы на основе сополимеров гидроксипропилметакриламида и лактата с ПЭГ с доксорубицином присоединенным через pH-чувствительный линкер были модифицированы наноантителом EGa1 для взаимодействия с EGFR. Полученные мицеллы обладали как способностью тормозить рост ксенографтов клеток рака головы и шеи за счет блокирования EGFR, так и токсичностью за счет доставки доксорубицина в клетки [174]. Подобная мицеллярная конструкция, несущая паклитаксел, была создана на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) и ПЭГ с присоединенным цетуксимабом [175]. Следующий вариант наночастиц с паклитакселом и квантовыми точками для тераностики содержит фосфолипид с присоединенным ПЭГ и лиганд к EGFR в виде цетуксимаба или аптамера. Мицеллы с лигандами к EGFR достоверно сильнее тормозили рост ксенотрансплантата рака поджелудочной железы, чем исходные варианты наночастиц [176]. Создаются также мицеллярные конструкции, доставляющие в клетки несколько терапевтических агентов. Примером такой конструкции могут служить катионные мицеллы с цетуксимабом, доставляющие цитотоксический гемцитабин и миРНК miR-205, сниженный уровень которой ассоциирован с опухолевыми стволовыми клетками. Такой подход, предназначенный для лечения прогрессирующего рака поджелудочной железы, привел к повышению эффективности терапии ксенографтов по сравнению с каждым из агентов, доставляемых мицеллами по отдельности [177]. Еще один вариант мицелл – токоферил-ПЭГ с присоединенным цетуксимабом был успешно использован для терапии ксенографтов трижды негативного рака молочной железы для доставки паклитаксела [178].

Ряд работ по направленной доставке цитотоксических средств используют лиганды к нескольким рецепторам раковых клеток. Особенно интересными представляются подходы с одновременной нацеленностью на EGFR, как рецептор, вызывающий эпителиально-мезенхимальный переход [4], и маркеры стволовых раковых клеток. Перспективным вариантом являются наночастицы из сополимеров PLGA с двойной специфичностью, обусловленной аптамерами к EGFR и CD133, нагруженные салиномицином, антибиотиком, наиболее активно действующим на стволовые клетки опухолей [179]. Подобной направленностью обладают наночастицы на основе гиалуроновой кислоты с двойной специфичностью – EGFR (пептид GE11) и CD44 за счет связывания с ней гиалуроновой кислоты. В качестве цитотоксического агента эти частицы несли сериновую протеазу гранзим Б [180].

К настоящему времени создано и проверено на модельных опухолях лабораторных животных большое количество сочетаний взаимодействующих с EGFR наночастиц и загружаемых в них терапевтических агентов. Так, гибридные липид-PLGA наночастицы с присоединенным ПЭГ и Fab′-фрагментами антител к EGFR, загруженные адрианомицином, тормозили рост ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы [181]. Несущие паклитаксел самособирающиеся липидные наночастицы, стабилизированные плюроником и ПЭГ, с присоединенными mAb к EGFR также показали увеличенную эффективность по отношению к клеткам рака яичника *in vitro* и *in vivo* [182]. Вариант с пролекарством паклитаксел-ацетатом, загруженным в наночастицы PLGA с присоединенным цетуксимабом, был исследован при терапии ксенографтов рака легкого A549 и не показал улучшения накопления в опухоли. Тем не менее иммунонаночастицы с цетуксимабом показали лучший терапевтический эффект по сравнению с исходными наночастицами [183]. Доставку паклитаксела в клетки рака желудка *in vitro* и *in vivo* обеспечивали наночастицы на основе полиглутамата и хитозана с присоединенным цетуксимабом [184]. Наночастицы PLGA с использованием цетуксимаба и паклитаксела показали также увеличение эффективности терапии ксенографтов рака легкого [185]. Наночастицы из двуокиси кремния с доксорубицином, модифицированные цетуксимабом, улучшали терапию ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы [186].

Многие перспективные варианты лекарственных средств используют вещества, о применении которых в медицинской практике нет достаточной информации. В таких случаях путь от результатов, полученных на культурах клеток и на животных, до клинического применения требует значительного времени и больших затрат. Примером попытки создания варианта с максимальным количеством уже разрешенных для лечения компонентов служат модифициро-

ванные ПЭГ липидные наночастицы на основе лецитина с присоединенным EGF, несущие гемцитабин [187].

Собственные свойства материала наночастиц также могут быть использованы при направленной доставке с помощью EGFR. Так, наночастицы оксида железа с присоединенным цетуксимабом могут быть использованы не только для магнитно-резонансной диагностики, но и для усиления эффекта радиотерапии. Попадая в клетки, такие частицы вызывают при облучении увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), что увеличивает эффект радиотерапии ксенографтов глиомы [188].

Дополнительное покрытие гемцитабином золотых наночастиц с присоединенным цетуксимабом оказывало терапевтический эффект при лечении ксенографтов аденокарциномы поджелудочной железы [189]. Нельзя не упомянуть и о возможности использования золотых наночастиц, покрытых антителами к EGFR для фототермального уничтожения клеток опухоли [190]. В этом случае специфическое поглощение наночастиц является причиной долговременного удерживания наночастиц в опухоли.

Приведенные примеры показывают широкое поле деятельности для совершенствования традиционных химиотерапевтических средств лечения рака с помощью их направленной доставки и добавления фармакокинетических, собственных транспортных и цитотоксических свойств. Общим для этих подходов является необходимость включения в состав конструкций элементов, предотвращающих поглощение частиц мононуклеарно-макрофагальной системой, в качестве которых чаще всего используют ПЭГ.

Радионуклидная терапия. В качестве цитотоксического начала в направленной радионуклидной терапии используются изотопы, испускающие α-, β-частицы, γ-излучение и электроны Оже (ЭО). Для β-частиц нахождение внутри клетки не имеет значения с точки зрения повреждения раковой клетки, эндоцитоз может только улучшить удержание в опухоли присоединенного к лекарственному средству β-излучателя. Действие α-частиц существенно более выражено при излучении внутри ядра, для проявления эффекта ЭО, как правило, необходима ядерная локализация. Часто радионуклиды, используемые для терапии и диагностики, испускают несколько видов излучения. С точки зрения доставки в клетки-мишени, наибольший интерес представляют ЭО, испускаемые в результате электронного захвата или внутренней конверсии. Они характеризуются очень малым пробегом в тканях (типично – в нанометровом диапазоне) и высокой линейной передачей энергии (9–26 кэВ/мкм). При распаде в непосредственной близости от ядерной ДНК эмиттеры ЭО являются перспективными агентами для избирательного уничтожения целевых клеток с минимальным повреждением окружающих [191]. Учитывая характерную для многих типов рака сверхэкспрессию EGFR на поверхности опухолевых клеток, а также способность EGFR импортироваться в ядро, были разработаны и разрабатываются различные варианты систем EGFR-направленной доставки эмиттеров ЭО разной степени сложности. Внутривенное введение меченных [^{125}I] мышиных mAb 425 приводило к существенному увеличению (с 7 до 16 месяцев) продолжительности жизни пациентов с тяжелыми формами глиобластомы при монотерапии [192]. Эти антитела являются отчасти интернализуемыми, как показали эксперименты с глиомными клеточными линиями от 20 до 40% антител, связанных с поверхностью клеток, могут интернализоваться [193]. Среди наиболее простых и хорошо изученных вариантов таких систем доставки находится EGF с присоединенным к нему хелатирующим агентом DTPA для связывания одного из перспективных для клинического применения эмиттеров ЭО – ^{111}In. Первые исследования эффективности [^{111}In]-DTPA-EGF были опубликованы 20 лет назад [191]. В них было показано, что [^{111}In]-DTPA-EGF проникал в экспрессирующие EGFR клетки рака молочной железы, при этом 15% интернализованной радиоактивности достигало клеточного ядра. Инкубация с [^{111}In]-DTPA-EGF значительно замедляла рост клеток-мишеней. В последующих работах была показана эффективность и безопасность подобного подхода *in vivo* на мышиной модели рака молочной железы [194], а также оценена потенциальная возможность замены EGF на связывающийся с EGFR, но не активирующий его, урезанный вариант EGF [195]. Первая фаза клинических исследований показала отсутствие высокой токсичности и иммуногенности [^{111}In]-DTPA-EGF после однократного введения [196]. Эффективность подобного подхода может быть улучшена путем введения в состав узнающих EGFR конструкций дополнительного сигнала ядерной локализации, позволяющего увеличить импорт в ядро. Так, добавление сигнала ядерной локализации в состав доставляющей ^{111}In конструкции на основе нимотузумаба (антитела к EGFR) значительно увеличило накопление радиоактивности в ядрах клеток рака молочной железы со сверхэкспрессией EGFR, тем самым придав конструкции большую цитотоксичность по сравнению с контрольной без сигнала ядерной локализации. Сигнал ядерной локализации был

успешно задействован и в более сложной системе двойной адресной доставки ^{111}In, где входящий в конструкцию EGF отвечал за узнавание клеток-мишеней, а антитело к γ-H2AX позволяло осуществить доставку радионуклида к маркеру ранней репарации ДНК гистону γ-H2AX [197]. Взаимодействие с опосредующими импорт в ядро факторами происходит в цитозоле, при этом после связывания с EGFR нацеленная на него конструкция претерпевает интернализацию и оказывается в замкнутых внутриклеточных везикулах. Собственный транспорт поверхностных рецепторов, в том числе для EGFR, в ядро невелик (см. раздел «Транспорт EGFR в ядро») и направлен в основном в лизосомы и на поверхность клетки. В то же время клетки обладают развитой системой транспорта между органеллами, которую можно использовать для изменения транспорта создаваемых лекарственных средств [198]. Для того чтобы доставить цитотоксические агенты в ядра клеток мишеней Sobolev et al. были разработаны рекомбинантные модульные конструкции, названные модульными нанотранспортерами (МНТ) [199-201]. Такие МНТ включают в себя следующие модули: EGF, связывание которого с EGFR на поверхности клеток-мишеней обеспечивает избирательность и запускает процесс интернализации; транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс), обеспечивающего выход транспортеров в цитозоль; сигнал ядерной локализации – большого Т-антигена вируса SV-40; а также бактериальный гемоглобиноподобный белок (HMP) – носитель [199]. Было показано сохранение функциональной активности каждого модуля, входящего в состав МНТ [202], способность МНТ достигать ядер EGFR-экспрессирующих раковых клеток *in vitro* [202] и *in vivo* [203]. Первые данные о перспективности использования МНТ для доставки эмиттеров ЭО в ядра раковых EGFR-экспрессирующих клеток были получены *in vitro* с использованием двух различных радионуклидов: ^{125}I [204] и ^{67}Ga [205]. В обоих случаях 55–60% интернализованных радионуклидов, доставляемых МНТ, достигало ядер целевых клеток, и наблюдалось многократное усиление их цитотоксичности по сравнению с контролями. Для осуществления эффективной доставки ^{111}In с использованием МНТ был сначала разработан метод присоединения данного эмиттера ЭО к белкам (в частности, МНТ), позволяющий получить меченый продукт с очень высокой удельной радиоактивностью [206]. В итоге эффективность повреждающего действия ^{111}In после присоединения к МНТ значительно увеличивалась как на EGFR-экспрессирующих раковых клетках в культуре [206–208], так и *in vivo* на животной модели после однократного местного введения в EGFR-экспрессирующую опухоль, что приводило к дозозависимому терапевтическому эффекту, вплоть до исчезновения опухолей у 40% животных в группе с наибольшей дозой препарата [207].

Вариантом использования радионуклидной терапии, основанной на использовании повышенной экспрессии EGFR, являются липосомы с присоединенным ^{186}Re (излучающий β-частицы и ЭО) или ^{188}Re (только β-частицы), которые вводили постоперационно в резекционную полость крыс с ортотопическими опухолями рака молочной железы человека. Такой подход призван улучшить существующие химиотерапевтические и радиотерапевтические варианты терапии, используемые в клинике [209].

Высокая линейная передача энергии (50–230 кэВ/мкм) и относительно небольшой пробег (50–100 мкм) α-частиц делают испускающие их радионуклиды более цитотоксичными в случае их распада внутри клетки [200]. Адресная доставка эмиттеров α-частиц внутрь раковых клеток, экспрессирующих EGFR, была успешно осуществлена в ряде исследований. В основном в качестве нацеливающей на EGFR молекулы используют давно применяемое в клинике моноклональное антитело к EGFR, цетуксимаб. Так, α-эмиттер ^{213}Bi, присоединенный к цетуксимабу, показал высокую цитотоксичность *in vitro* на клетках трижды негативного рака молочной железы, экспрессирующих EGFR [210]. *In vivo* ^{213}Bi, доставляемый анти-EGFR антителом матузумабом, показал высокую эффективность на ортотопической мышиной модели рака мочевого пузыря человека, значительно увеличив продолжительность жизни животных по сравнению с контрольными группами [211, 212]. Пилотное исследование эффективности местного применения ^{213}Bi, доставляемого цетуксимабом, для лечения рака мочевого пузыря на стадии *in situ* продемонстрировало потенциальную перспективность такого подхода: у 3 из 12 пациентов наблюдалась полная ремиссия после одно- или двукратной инстилляции данного радиофармпрепарата [213].

На мышиной модели диссеминированных внутрибрюшинных опухолей LS-174T (рак кишечника человека) была показана эффективность противоопухолевого действия другого α-эмиттера, ^{212}Pb, доставляемого цетуксимабом: медианная продолжительность жизни животных увеличилась до 84 дней по сравнению с 34 днями в группе животных, которым вводили ^{212}Pb, доставляемый неспецифическим антителом [214]. Эффективность терапии ^{212}Pb–цетук-

симабом можно было еще увеличить как предварительным введением гемцитабина, так и комбинацией ^{212}Pb–трастузумабом, антителом к HER-2.

Доставка радионуклидов, испускающих α-частицы в ядра клеток-мишеней, позволяет увеличить как повреждающее действие на клетку самой α-частицы, так и задействовать цитотоксический потенциал ядер отдачи, образующихся при α-распаде [215]. Так, при доставке ^{211}At, присоединенного к МНТ, было показано специфичное увеличение цитотоксичности данного α-эмиттера до 18 раз на нескольких линиях раковых клеток со сверхэкспрессией EGFR [216].

Иммунотоксины. Использование в качестве токсического начала каталитических субъединиц бактериальных токсинов представляет собой еще один из возможных вариантов противоопухолевых средств. Такие вещества включают в себя токсин, в котором лигандная часть, обеспечивающая связывание с клетками, заменена на антитело, его фрагмент или другой лиганд к выбранному интернализуемому рецептору. Общепринятое название – иммунотоксины – не совсем удачно, поскольку к этому типу противораковых агентов относят и фрагменты токсинов, химически соединенные или генно-инженерно слитые с природными лигандами. К настоящему времени было создано и исследовано более полутора десятков конструкций с лигандами к EGFR и частями различных токсинов, главным образом псевдомонадного экзотоксина, дифтерийного токсина и сапорина [217–219]. Природные токсины помимо собственно токсической активности обладают также собственным механизмом проникновения в цитозоль клетки. Например, дифтерийный токсин за счет транслокационного домена в слабокислой среде способен к встраиванию в мембрану эндосомы и переносу каталитической субъединицы в цитозоль, псевдомонадный экзотоксин по системе везикулярного транспорта через аппарат Гольджи попадает в ЭР и оттуда путем ретроградного транспорта в цитозоль. АДФ-рибозилирующие субъединицы этих токсинов обладают крайне высокой цитотоксичностью, что часто ставит вопрос о достаточности для терапевтического применения ширины терапевтического диапазона иммунотоксинов [220]. Тем не менее три иммунотоксина уже получили одобрение для клинического применения при лечении нескольких гематологических онкологий: на основе IL-2 и части дифтерийного токсина (Онтак) для лечения Т-клеточной лимфомы; анти-CD22 с частью псевдомонадного экзотоксина (Лумоситиі) для лечения волосатоклеточного лейкоза и на основе IL-3 с частью дифтерийного токсина (Элзонрис) для лечения злокачественных бластных плазмоцитоидных дендритных клеток [220].

Создание лекарственного средства, использующего такой принцип для лечения солидных опухолей, представляет собой более сложную задачу. Тем не менее одно из таких соединений, ТП-38, представляющее собой лиганд к EGFR, TGFα, слитый с частью псевдомонадного экзотоксина с делецией, оставляющей токсическую АДФ-рибозилирующую активность, но неспособной связываться с клетками, показало обещающие результаты в доклинических исследованиях. Этот иммунотоксин был применен для проверки возможности лечения глиобластомы при местном введении в головной мозг при помощи конвекционно-усиленной доставки. Для глиобластом характерна частая сверхэкспрессия EGFR (см. раздел «Экспрессия EGFR при онкологических заболеваниях»). Исследования показали, что такой метод интрапаренхимальной доставки лекарственных средств привел к полному ответу на лечение у нескольких пациентов [221]. Аналогичный иммунотоксин (D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL) [222] был создан с использованием вариабельного фрагмента антитела, способного связываться как с диким типом EGFR, так и с EGFRvIII (постоянно активированным мутантом, делеционным по части внеклеточного домена рецептора) [223], который особенно часто встречается при глиобластомах. Данная конструкция показала значительное увеличение продолжительности жизни животных при терапии ортотопических опухолей глиом человека у иммунодефицитных мышей [224]. Сочетание терапии D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL ортотопических опухолей головного мозга у мышей с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа αCTLA-4/αPD-1/αPD-L1 позволило элиминировать экспериментальные глиомы у части животных [225].

Доставка фотосенсибилизаторов. ФДТ представляет собой достаточно интересный и перспективный подход к лечению ряда заболеваний, в первую очередь онкологических [226]. Данный вид терапии основан на избирательном накоплении в опухоли ФС и последующем ее облучении светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения ФС. При этом происходит запуск фотодинамических реакций, приводящих к образованию АФК, обладающих сильным повреждающим действием. Пробег наиболее реакционноспособных АФК (синглетный кислород, гидроксильный радикал) ограничен несколькими десятками нанометров, что делает их наиболее эффективными в случае попадания в ядро целевой клетки [227, 228]. Для

доставки ФС в ядра раковых клеток-мишеней были исследованы МНТ, в том числе нацеленные на EGFR. Было показано сохранение способности ФС, присоединенных к МНТ, генерировать АФК при облучении [202]. ФС, присоединенный к МНТ, обладал на три порядка увеличенной фотоцитотоксичностью на культурах раковых клеток со сверхэкспрессией EGFR по сравнению со свободным ФС [229, 202]. Значительное увеличение эффективности фотодинамического действия ФС, присоединенного к МНТ, по сравнению со свободным было показано *in vivo* на бестимусных мышах с привитой эпидермоидной карциномой человека A431, характеризующейся сверхэкспрессией EGFR. Так, эффективность проводимой ФДТ привела к 75% выживших животных, при лечении ФС, доставляемым МНТ, при 20% выживших животных при лечении в идентичных условиях свободным ФС [203].

Среди наиболее продвинутых к использованию средств необходимо отметить RM-1929, представляющее собой иммуноконъюгат ФС dyeIRDye700DX с цетуксимабом, антителом к EGFR, в настоящее время проходящий клинические испытания для лечения рецидивирующего рака головы и шеи методом ФДТ [230]. Целый ряд иммуноконъюгатов ФС mAb или их фрагментами находится на стадии доклинических исследований [231].

Генотерапевтические подходы. Несколько комбинированных подходов было предложено для транспорта через EGFR генетического материала, генов и миРНК. Для этого использовали, например перенацеливание аденовирусной трансфекции на клетки, сверхэкспрессирующие EGFR с помощью химерного белка, состоящего из EGFR и внеклеточного домена рецептора аденовируса hCAR (human coxsackie B and adenovirus receptor) [232]. Модифицированный аденовирус, доставляющий ген тимидинкиназы вируса простого герпеса человека, обеспечивал уничтожение клеток опухоли яичников, что замедляло рост ксенографтов [232]. Другим вариантом комбинированного подхода является доставка гена натрий-иодидного транспортера, который способен накачивать в клетки иодид. Наночастицы на основе полиэтиленимина и GE11 доставляли этот ген в ксенографты рака толстой кишки, что обеспечивало как визуализацию опухолей, так и торможение их роста [233]. Липосомы с миРНК для инактивации сурвивина с двумя лигандами – пептид GE11 к EGFR и гиалуроновая кислота к CD44 – тормозили рост ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы [234]. Нельзя не отметить, что EGFR, в особенности его мутантный вариант EGFRvIII, образующий уникальный эпитоп, интенсивно исследуются, в том числе, в нескольких клинических испытаниях на возможность использования в CAR-T терапии [235].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Анализ тенденций исследования EGFR, его участия в онкологических заболеваниях и разработке методов использования для лечения показывает, что, как и прежде, большое внимание уделяется способам блокирования EGFR-опосредованной сигнализации. Однако все больший интерес вызывают подходы, интегрирующие использование сверхэкспрессии и изменения в EGFR с дополнительными воздействием, прежде всего, поражающим, на раковые клетки [93, 236, 237]. Помимо традиционных широко применяемых комбинаторных подходов с одновременным использованием нескольких лекарств, создаются многофункциональные системы, сочетающие доставку с несколькими одновременно или последовательно применяемыми адресами с уничтожающим измененную клетку воздействием. Наряду с направленным цитотоксическим воздействием рецептор-опосредуемая доставка в клетку-мишень может быть использована и для вмешательства во внутриклеточную регуляцию, например путем доставки блокирующих регуляторные процессы антител или транскрипционных факторов [238–240]. EGFR, как один из наиболее изученных входов в сигнальную систему, регулирующую извне пролиферацию клетки, является часто используемым вариантом для обкатки новых систем доставки в клетку-мишень. Сложности на пути практического использования таких подходов добавляет необходимость учета возможностей организма по нейтрализации чужеродных веществ и частиц, однако эти препятствия не выглядят непреодолимыми в обозримой перспективе.

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-50385\19).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., and Burgess, A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling, *Exp. Cell Res.*, **284**, 31-53, doi: 10.1016/s0014-4827(02)00098-8.
2. Yarden, Y., and Pines, G. (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 553-563, doi: 10.1038/nrc3309.
3. Roskoski, R., Jr. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, *Pharmacol. Res.*, **79**, 34-74, doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.
4. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 178-196, doi: 10.1038/nrm3758.
5. Sigismund, S., Avanzato, D., and Lanzetti, L. (2018) Emerging functions of the EGFR in cancer, *Mol. Oncol.*, **12**, 3-20, doi: 10.1002/1878-0261.12155.
6. 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.
7. Arkhipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N. F., Eastwood, M. P., Wemmer, D. E., Kuriyan, J., and Shaw, D. E. (2013) Architecture and membrane interactions of the EGF receptor, *Cell*, **152**, 557-569, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.030.
8. Purba, E. R., Saita, E. I., and Maruyama, I. N. (2017) Activation of the EGF receptor by ligand binding and oncogenic mutations: the “rotation model”, *Cells*, **6**, 13, doi: 10.3390/cells6020013.
9. Holbro, T., and Hynes, N. E. (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 195-217, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440.
10. Frolov, A., Schuller, K., Tzeng, C. W., Cannon, E. E., Ku, B. C., Howard, J. H., Vickers, S. M., Heslin, M. J., Buchsbaum, D. J., and Arnoletti, J. P. (2007) ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib, *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 548-554, doi: 10.4161/cbt.6.4.3849.
11. Zhu, S., Belkhiri, A., and El-Rifai, W. (2011) DARPP-32 increases interactions between epidermal growth factor receptor and ERBB3 to promote tumor resistance to gefitinib, *Gastroenterology*, **141**, 1738-1748, doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.070.
12. Huang, Z., Wang, Y., Nayak, P. S., Dammann, C. E., and Sanchez-Esteban, J. (2012) Stretch-induced fetal type II cell differentiation is mediated via ErbB1-ErbB4 interactions, *J. Biol. Chem.*, **287**, 18091-18102, doi: 10.1074/jbc.M111.313163.
13. Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K., and Berk, B. C. (2001) Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6387-6394, doi: 10.1128/mcb.21.19.6387-6394.2001.
14. Black, P. C., Brown, G. A., Dinney, C. P., Kassouf, W., Inamoto, T., Arora, A., Gallagher, D., Munsell, M. F., Bar-Eli, M., McConkey, D. J., and Adam, L. (2011) Receptor heterodimerization: a new mechanism for platelet-derived growth factor induced resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy for bladder cancer, *J. Urol.*, **185**, 693-700, doi: 10.1016/j.juro.2010.09.082.
15. 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.
16. Peace, B. E., Hill, K. J., Degen, S. J., and Waltz, S. E. (2003) Cross-talk between the receptor tyrosine kinases Ron and epidermal growth factor receptor, *Exp. Cell Res.*, **289**, 317-325, doi: 10.1016/s0014-4827(03)00280-5.
17. Morgillo, F., Woo, J. K., Kim, E. S., Hong, W. K., and Lee, H. Y. (2006) Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib, *Cancer Res.*, **66**, 10100-10111, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1684.
18. Needham, S. R., Roberts, S. K., Arkhipov, A., Mysore, V. P., Tynan, C. J., Zanetti-Domingues, L. C., Kim, E. T., Losasso, V., Korovesis, D., Hirsch, M., Rolfe, D. J., Clarke, D. T., Winn, M. D., Lajevardipour, A., Clayton, A. H., Pike, L. J., Perani, M., Parker, P. J., Shan, Y., Shaw, D. E., and Martin-Fernandez, M. L. (2016) EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms, *Nat. Commun.*, **7**, 13307, doi: 10.1038/ncomms13307.
19. Ibach, J., Radon, Y., Gelleri, M., Sonntag, M. H., Brunsveld, L., Bastiaens, P. I., and Verveer, P. J. (2015) Single particle tracking reveals that EGFR signaling activity is amplified in clathrin-coated pits, *PLoS One*, **10**, e0143162, doi: 10.1371/journal.pone.0143162.
20. Clarke, D. T., and Martin-Fernandez, M. L. (2019) A brief history of single-particle tracking of the epidermal growth factor receptor, *Methods Protoc.*, **2**, 12, doi: 10.3390/mps2010012.
21. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, **141**, 1117-1134, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
22. Macdonald, J. L., and Pike, L. J. (2008) Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 112-117, doi: 10.1073/pnas.0707080105.
23. Riese, D. J., and Stern, D. F. (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network, *Bioessays*, **20**, 41-48, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<41::AID-BIES7>3.0.CO;2-V.
24. Wang, Y. N., Lee, H. H., Chou, C. K., Yang, W. H., Wei, Y., Chen, C. T., Yao, J., Hsu, J. L., Zhu, C., Ying, H., Ye, Y., Wang, W. J., Lim, S. O., Xia, W., Ko, H. W., Liu, X., Liu, C. G., Wu, X., Wang, H., Li, D., Prakash, L. R., Katz, M. H., Kang, Y., Kim, M., Fleming, J. B., Fogelman, D., Javle, M., Maitra, A., and Hung, M. C. (2018) Angiogenin/ribonuclease 5 is an EGFR ligand and a serum biomarker for erlotinib sensitivity in pancreatic cancer, *Cancer Cell*, **33**, 752-769, doi: 10.1016/j.ccell.2018.02.012.
25. Wang, Y. N., Lee, H. H., and Hung, M. C. (2018) A novel ligand-receptor relationship between families of ribonucleases and receptor tyrosine kinases, *J. Biomed. Sci.*, **25**, 83, doi: 10.1186/s12929-018-0484-7.
26. Pinkas-Kramarski, R., Shelly, M., Guarino, B. C., Wang, L. M., Lyass, L., Alroy, I., Alimandi, M., Kuo, A., Moyer, J. D., Lavi, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B. J., Seger, R., Bacus, S. S., Pierce, J. H., Andrews, G. C., and Yarden, Y. (1998) ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network, *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6090-6101, doi: 10.1128/mcb.18.10.6090.
27. Gilmore, J. L., Gallo, R. M., and Riese, D. J. (2006) The epidermal growth factor receptor (EGFR)-S442F mutant displays increased affinity for neuregulin-2beta and agonist-independent coupling with downstream sig-

nalling events, *Biochem. J.*, **396**, 79-88, doi: 10.1042/BJ20051687.
28. Santra, M., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2002) Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope, *J. Biol. Chem.*, **277**, 35671-35681, doi: 10.1074/jbc.M205317200.
29. Zhu, J. X., Goldoni, S., Bix, G., Owens, R. T., McQuillan, D. J., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2005) Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 32468-32479, doi: 10.1074/jbc.M503833200.
30. Goldoni, S., Iozzo, R. A., Kay, P., Campbell, S., McQuillan, A., Agnew, C., Zhu, J. X., Keene, D. R., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2007) A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer cell growth by attenuating basal and ligand-dependent EGFR activity, *Oncogene*, **26**, 368-381, doi: 10.1038/sj.onc.1209803.
31. Zheng, Y., Li, X., Qian, X., Wang, Y., Lee, J. H., Xia, Y., Hawke, D. H., Zhang, G., Lyu, J., and Lu, Z. (2015) Secreted and O-GlcNAcylated MIF binds to the human EGF receptor and inhibits its activation, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1348-1355, doi: 10.1038/ncb3222.
32. Freed, D. M., Bessman, N. J., Kiyatkin, A., Salazar-Cavazos, E., Byrne, P. O., Moore, J. O., Valley, C. C., Ferguson, K. M., Leahy, D. J., Lidke, D. S., and Lemmon, M. A. (2017) EGFR ligands differentially stabilize receptor dimers to specify signaling kinetics, *Cell*, **171**, 683-695, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.017.
33. Macdonald-Obermann, J. L., and Pike, L. J. (2014) Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation, *J. Biol. Chem.*, **289**, 26178-26188, doi: 10.1074/jbc.M114.586826.
34. Liao, H. W., Hsu, J. M., Xia, W., Wang, H. L., Wang, Y. N., Chang, W. C., Arold, S. T., Chou, C. K., Tsou, P. H., Yamaguchi, H., Fang, Y. F., Lee, H. J., Lee, H. H., Tai, S. K., Yang, M. H., Morelli, M. P., Sen, M., Ladbury, J. E., Chen, C. H., Grandis, J. R., Kopetz, S., and Hung, M. C. (2015) PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response, *J. Clin. Invest.*, **125**, 4529-4543, doi: 10.1172/JCI82826.
35. Wang, W. J., Hsu, J. M., Wang, Y. N., Lee, H. H., Yamaguchi, H., Liao, H. W., and Hung, M. C. (2019) An essential role of PRMT1-mediated EGFR methylation in EGFR activation by ribonuclease 5, *Am. J. Cancer Res.*, **9**, 180-185.
36. Caldieri, G., Malabarba, M. G., Di Fiore, P. P., and Sigismund, S. (2018) EGFR trafficking in physiology and cancer, *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **57**, 235-272, doi: 10.1007/978-3-319-96704-2_9.
37. Sorkin, A., and Goh, L. K. (2008) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs, *Exp. Cell Res.*, **315**, 683-696, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.029.
38. Goh, L. K., and Sorkin, A. (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017459, doi: 10.1101/cshperspect.a017459.
39. Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., and Yarden, Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.*, **274**, 22151-22154, doi: 10.1074/jbc.274.32.22151.
40. Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 858-870, doi: 10.1091/mbc.e02-08-0532.
41. Sigismund, S., Algisi, V., Nappo, G., Conte, A., Pascolutti, R., Cuomo, A., Bonaldi, T., Argenzio, E., Verhoef, L. G., Maspero, E., Bianchi, F., Capuani, F., Ciliberto, A., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2013) Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate, *EMBO J.*, **32**, 2140-2157, doi: 10.1038/emboj.2013.149.
42. Huang, F., Goh, L. K., and Sorkin, A. (2007) EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **104**, 16904-16909.
43. Goh, L. K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., and Sorkin, A. (2010) Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor, *J. Cell Biol.*, **189**, 871-883, doi: 10.1083/jcb.201001008.
44. Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonico, E., Shtiegman, K., Marmor, M. D., Kochupurakkal, B. S., Katz, M., Lavi, S., Cesareni, G., and Yarden, Y. (2006) Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.*, **281**, 21640-21651, doi: 10.1074/jbc.M513034200.
45. Boucrot, E., Ferreira, A. P., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., and McMahon, H. T. (2015) Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway, *Nature*, **517**, 460-465, doi: 10.1038/nature14067.
46. Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation, *Dev. Cell*, **15**, 209-219, doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.012.
47. Sorkin, A., Krolenko, S., Kudrjavtceva, N., Lazebnik, J., Teslenko, L., Soderquist, A. M., and Nikolsky, N. (1991) Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways, *J. Cell Biol.*, **112**, 55-63, doi: 10.1083/jcb.112.1.55.
48. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors, *Nature*, **416**, 183-187, doi: 10.1038/416183a.
49. Henriksen, L., Grandal, M. V., Knudsen, S. L. J., van Deurs, B., and Grovdal, L. M. (2013) Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands, *PLoS One*, **8**, e58148, doi: 10.1371/journal.pone.0058148.
50. West, M. A., Bretscher, M. S., and Watts, C. (1989) Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells, *J. Cell Biol.*, **109**, 2731-2739, doi: 10.1083/jcb.109.6.2731.
51. Yamazaki, T., Zaal, K., Hailey, D., Presley, J., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (2002) Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization, *J. Cell Sci.*, **115**, 1791-1802.
52. Orth, J. D., Krueger, E. W., Weller, S. G., and McNiven, M. A. (2006) A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization, *Cancer Res.*, **66**, 3603-3610, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2916.
53. Tomas, A., Futter, C. E., and Eden, E. R. (2014) EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer, *Trends Cell Biol.*, **24**, 26-34.
54. Wang, Y. N., Wang, H., Yamaguchi, H., Lee, H. J., Lee, H. H., and Hung, M. C. (2010) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **399**, 498-504, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.096.
55. Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Huttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S. J. (2009) Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect, *J. Biol. Chem.*, **284**, 36592-36604, doi: 10.1074/jbc.M109.000760.
56. Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., and Lo, H. W. (2011) EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase

inhibitor-induced mitochondrial translocalization: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis, *Mol. Cancer*, **10**, 26, doi: 10.1186/1476-4598-10-26.

57. Wang, T. H., Lin, Y. H., Yang, S. C., Chang, P. C., Wang, T. C., and Chen, C. Y. (2017) Tid1-S regulates the mitochondrial localization of EGFR in non-small cell lung carcinoma, *Oncogenesis*, **6**, e361, doi: 10.1038/oncsis.2017.62.
58. Che, T. F., Lin, C. W., Wu, Y. Y., Chen, Y. J., Han, C. L., Chang, Y. L., Wu, C. T., Hsiao, T. H., Hong, T. M., and Yang, P. C. (2015) Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC, *Oncotarget*, **6**, 37349-37366, doi: 10.18632/oncotarget.5736.
59. Hsu, S. C., and Hung, M. C. (2007) Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family, *J. Biol. Chem.*, **282**, 10432-10440, doi: 10.1074/jbc.M610014200.
60. Shah, P., Chaumet, A., Royle, S. J., and Bard, F. A. (2019) The NAE pathway: autobahn to the nucleus for cell surface receptors, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/cells8080915.
61. Lo, H. W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S. C., and Hung, M. C. (2006) Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1, *J. Cell Biochem.*, **98**, 1570-1583, doi: 10.1002/jcb.20876.
62. De Angelis Campos, A. C., Rodrigues, M. A., de Andrade, C., de Goes, A. M., Nathanson, M. H., and Gomes, D. A. (2011) Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 341-346, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100.
63. Lo, H. W. (2010) Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications, *Discov. Med.*, **10**, 44-51.
64. Faria, J. A. Q. A., de Andrade, C., Goes, A. M., Rodrigues, M. A., and Gomes, D. A. (2016) Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 39-45, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.097.
65. Han, W., and Lo, H. W. (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations, *Cancer Lett.*, **318**, 124-134, doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.011.
66. Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Hsu, J. M., and Hung, M. C. (2010) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins, *Oncogene*, **29**, 3997-4006, doi: 10.1038/onc.2010.157.
67. Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H. J., Lee, H. H., Wang, H., Hsu, J. M., and Hung, M. C. (2010) The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus, *J. Biol. Chem.*, **285**, 38720-38729, doi: 10.1074/jbc.M110.158659.
68. Liao, H. J., and Carpenter, G. (2007) Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1064-1072, doi: 10.1091/mbc.e06-09-0802.
69. Chaumet, A., Wright, G. D., Seet, S. H., Tham, K. M., Gounko, N. V., and Bard, F. (2015) Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus, *Nat. Commun.*, **6**, 8218, doi: 10.1038/ncomms9218.
70. Chia, P. L., Scott, A. M., and John, T. (2019) Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in mesothelioma, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **16**, 441-451, doi: 10.1080/17425247.2019.1598374.
71. Franovic, A., Gunaratnam, L., Smith, K., Robert, I., Patten, D., and Lee, S. (2007) Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13092-13097, doi: 10.1073/pnas.0702387104.
72. Liu, X., Wang, P., Zhang, C., and Ma, Z. (2017) Epidermal growth factor receptor (EGFR): a rising star in the era of precision medicine of lung cancer, *Oncotarget*, **8**, 50209-50220, doi: 10.18632/oncotarget.16854.
73. Grandis, J. R., and Tweardy, D. J. (1993) Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer, *Cancer Res.*, **53**, 3579-3584.
74. Atkins, D., Reiffen, K. A., Tegtmeier, C. L., Winther, H., Bonato, M. S., and Storkel, S. (2004) Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, **52**, 893-901, doi: 10.1369/jhc.3A6195.2004.
75. Yen, L. C., Uen, Y. H., Wu, D. C., Lu, C. Y., Yu, F. J., Wu, I. C., Lin, S. R., and Wang, J. Y. (2010) Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, *Ann. Surg.*, **251**, 254-260, doi: 10.1097/SLA.0b013e3181bc9d96.
76. Lee, H. J., Xu, X., Choe, G., Chung, D. H., Seo, J. W., Lee, J. H., Lee, C. T., Jheon, S., Sung, S. W., and Chung, J. H. (2010) Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study, *Lung Cancer*, **68**, 375-382, doi: 10.1016/j.lungcan.2009.07.014.
77. Gatalica, Z., Millis, S. Z., Vranic, S., Bender, R., Basu, G. D., Voss, A., and Von Hoff, D. D. (2014) Comprehensive tumor profiling identifies numerous biomarkers of drug response in cancers of unknown primary site: analysis of 1806 cases, *Oncotarget*, **5**, 12440-12447, doi: 10.18632/oncotarget.2574.
78. Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, *Cancer Cell*, **17**, 98-110.
79. Herbst, R. S., and Shin, D. M. (2002) Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy, *Cancer*, **94**, 1593-1611, doi: 10.1002/cncr.10372.
80. Kalyankrishna, S., and Grandis, J. R. (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer, *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2666-2672, doi: 10.1200/JCO.2005.04.8306.
81. Chua, D. T., Nicholls, J. M., Sham, J. S., and Au, G. K. (2004) Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **59**, 11-20, doi: 10.1016/j.ijrobp.2003.10.038.
82. Wei, Q., Chen, L., Sheng, L., Nordgren, H., Wester, K., and Carlsson, J. (2007) EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases, *Int. J. Oncol.*, **31**, 493-499.
83. Grobe, A., Eichhorn, W., Fraederich, M., Kluwe, L., Vashist, Y., Wikner, J., Smeets, R., Simon, R., Sauter, G., Heiland, M., and Blessmann, M. (2014) Immunohistochemical and FISH analysis of EGFR and its prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma, *J. Oral. Pathol. Med.*, **43**, 205-210, doi: 10.1111/jop.12111.

84. Wang, X., Niu, H., Fan, Q., Lu, P., Ma, C., Liu, W., Liu, Y., Li, W., Hu, S., Ling, Y., Guo, L., Ying, J., and Huang, J. (2016) Predictive value of EGFR overexpression and gene amplification on icotinib efficacy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, **7**, 24744-24751, doi: 10.18632/oncotarget.8271.
85. Politi, A., Tsiambas, E., Mastronikolis, N. S., Peschos, D., Asproudis, I., Kyrodimos, E., Armata, I. E., Chrysovergis, A., Asimakopoulos, A., Papanikolaou, V. S., Batistatou, A., and Ragos, V. (2019) Combined EGFR/ALK expression analysis in laryngeal squamous cell carcinoma, *In Vivo*, **33**, 815-819, doi: 10.21873/invivo.11544.
86. Schrevel, M., Gorter, A., Kolkman-Uljee, S. M., Trimbos, J. B., Fleuren, G. J., and Jordanova, E. S. (2011) Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer, *Mod. Pathol.*, **24**, 720-728, doi: 10.1038/modpathol.2010.239.
87. Gui, T., and Shen, K. (2012) The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer, *Cancer Epidemiol.*, **36**, 490-496, doi: 10.1016/j.canep.2012.06.005.
88. Tian, W. J., Huang, M. L., Qin, Q. F., Chen, Q., Fang, K., and Wang, P. L. (2016) Prognostic impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer: a meta-analysis, *PLoS One*, **11**, e0158787, doi: 10.1371/journal.pone.0158787.
89. Li, Q., Tang, Y., Cheng, X., Ji, J., Zhang, J., and Zhou, X. (2014) EGFR protein expression and gene amplification in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **7**, 733-741.
90. Rokita, M., Stec, R., Bodnar, L., Charkiewicz, R., Korniluk, J., Smoter, M., Cichowicz, M., Chyczewski, L., Niklinski, J., Kozlowski, W., and Szczylik, C. (2013) Overexpression of epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in colorectal cancer on the basis of the Allred scoring system, *Onco. Targets Ther.*, **6**, 967-976, doi: 10.2147/OTT.S42446.
91. Yun, S., Kwak, Y., Nam, S. K., Seo, A. N., Oh, H. K., Kim, D. W., Kang, S. B., and Lee, H. S. (2018) Ligand-independent epidermal growth factor receptor overexpression correlates with poor prognosis in colorectal cancer, *Cancer Res. Treat.*, **50**, 1351-1361, doi: 10.4143/crt.2017.487.
92. Huang, C. W., Chen, Y. T., Tsai, H. L., Yeh, Y. S., Su, W. C., Ma, C. J., Tsai, T. N., and Wang, J. Y. (2017) EGFR expression in patients with stage III colorectal cancer after adjuvant chemotherapy and on cancer cell function, *Oncotarget*, **8**, 114663-114676, doi: 10.18632/oncotarget.23072.
93. Grapa, C. M., Mocan, T., Gonciar, D., Zdrehus, C., Mosteanu, O., Pop, T., and Mocan, L. (2019) Epidermal growth factor receptor and its role in pancreatic cancer treatment mediated by nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*, **14**, 9693-9706, doi: 10.2147/IJN.S226628.
94. Cook, N., Frese, K. K., and Moore, M. (2014) Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer, *Gastrointest Cancer*, **4**, 23-37.
95. Karandish, F., and Mallik, S. (2016) Biomarkers and targeted therapy in pancreatic cancer, *Biomarkers Cancer*, **8**, BIC-S34414.
96. Park, S. J., Gu, M. J., Lee, D. S., Yun, S. S., Kim, H. J., and Choi, J. H. (2015) EGFR expression in pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 8298-8304.
97. Gonzalez-Conchas, G. A., Rodriguez-Romo, L., Hernandez-Barajas, D., Gonzalez-Guerrero, J. F., Rodriguez-Fernandez, I. A., Verdines-Perez, A., Templeton, A. J., Ocana, A., Seruga, B., Tannock, I. F., Amir, E., and Vera-Badillo, F. E. (2018) Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and a meta-analysis, *Cancer Treat. Rev.*, **62**, 1-8, doi: 10.1016/j.ctrv.2017.10.008.
98. Sheng, Q., and Liu, J. (2011) The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer, *Br. J. Cancer*, **104**, 1241-1245, doi: 10.1038/bjc.2011.62.
99. Wang, K., Li, D., and Sun, L. (2016) High levels of EGFR expression in tumor stroma are associated with aggressive clinical features in epithelial ovarian cancer, *Onco Targets Ther.*, **9**, 377-386, doi: 10.2147/OTT.S96309.
100. Perren, T. J. (2016) Mucinous epithelial ovarian carcinoma, *Ann. Oncol.*, **27** Suppl. 1, i53-i57, doi: 10.1093/annonc/mdw087.
101. Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., and Ushio, Y. (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme, *Cancer Res.*, **63**, 6962-6970.
102. Zhao, L. L., Xu, K. L., Wang, S. W., Hu, B. L., and Chen, L. R. (2012) Pathological significance of epidermal growth factor receptor expression and amplification in human gliomas, *Histopathology*, **61**, 726-736, doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04354.x.
103. Wang, X., Zhang, S., MacLennan, G. T., Eble, J. N., Lopez-Beltran, A., Yang, X. J., Pan, C. X., Zhou, H., Montironi, R., and Cheng, L. (2007) Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 953-957, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2167.
104. Chaux, A., Cohen, J. S., Schultz, L., Albadine, R., Jadallah, S., Murphy, K. M., Sharma, R., Schoenberg, M. P., and Netto, G. J. (2012) High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues, *Hum. Pathol.*, **43**, 1590-1595, doi: 10.1016/j.humpath.2011.11.016.
105. Carlsson, J., Wester, K., De La Torre, M., Malmstrom, P. U., and Gardmark, T. (2015) EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides, *Radiol. Oncol.*, **49**, 50-58, doi: 10.2478/raon-2014-0015.
106. Girard, N. (2010) Thymic tumors: relevant molecular data in the clinic, *J. Thorac. Oncol.*, **5**, S291-S295, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f209b9.
107. Rusch, V. W., Klimstra, D. S., and Venkatraman, E. S. (1996) Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors, *Ann. Thorac. Surg.*, **62**, 798-809, doi: 10.1016/s0003-4975(96)00435-3.
108. Srirajaskanthan, R., Shah, T., Watkins, J., Marelli, L., Khan, K., and Caplin, M. E. (2010) Expression of the HER-1-4 family of receptor tyrosine kinases in neuroendocrine tumours, *Oncol. Rep.*, **23**, 909-915, doi: 10.3892/or_00000714.
109. London, M., and Gallo, E. (2020) Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in epithelial-derived cancers and its current antibody-based immunotherapies, *Cell Biol. Int.*, **44**, 1267-1282, doi: 10.1002/cbin.11340.
110. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., and Van Cutsem, E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 337-345, doi: 10.1056/NEJMoa033025.
111. Trivedi, S., Srivastava, R. M., Concha-Benavente, F., Ferrone, S., Garcia-Bates, T. M., Li, J., and Ferris, R. L.

(2016) Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences antitumor cellular immunity in head and neck cancer patients, *Clin. Cancer Res.*, **22**, 5229-5237, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2971.

112. Cohenuram, M., and Saif, M. W. (2007) Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic, *Anticancer Drugs*, **18**, 7-15, doi: 10.1097/CAD.0b013e32800feecb.
113. Thatcher, N., Hirsch, F. R., Luft, A. V., Szczesna, A., Ciuleanu, T. E., Dediu, M., Ramlau, R., Galiulin, R. K., Balint, B., Losonczy, G., Kazarnowicz, A., Park, K., Schumann, C., Reck, M., Depenbrock, H., Nanda, S., Kruljac-Letunic, A., Kurek, R., Paz-Ares, L., and Socinski, M. A. (2015) Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial, *Lancet Oncol.*, **16**, 763-774, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00021-2.
114. Li, J., and Yan, H. (2018) Skin toxicity with anti-EGFR monoclonal antibody in cancer patients: a meta-analysis of 65 randomized controlled trials, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **82**, 571-583, doi: 10.1007/s00280-018-3644-2.
115. Boland, W. K., and Bebb, G. (2009) Nimotuzumab: a novel anti-EGFR monoclonal antibody that retains anti-EGFR activity while minimizing skin toxicity, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9**, 1199-1206, doi: 10.1517/14712590903110709.
116. Garrido, G., Tikhomirov, I. A., Rabasa, A., Yang, E., Gracia, E., Iznaga, N., Fernandez, L. E., Crombet, T., Kerbel, R. S., and Perez, R. (2011) Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile, *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 373-382, doi: 10.4161/cbt.11.4.14097.
117. Ciardiello, F., and Tortora, G. (2008) EGFR antagonists in cancer treatment, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1160-1174, doi: 10.1056/NEJMra0707704.
118. Therkildsen, C., Bergmann, T. K., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S., and Nilbert, M. (2014) The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, *Acta Oncol.*, **53**, 852-864, doi: 10.3109/0284186X.2014.895036.
119. Lu, Y., Zhao, X., Liu, Q., Li, C., Graves-Deal, R., Cao, Z., Singh, B., Franklin, J. L., Wang, J., Hu, H., Wei, T., Yang, M., Yeatman, T. J., Lee, E., Saito-Diaz, K., Hinger, S., Patton, J. G., Chung, C. H., Emmrich, S., Klusmann, J. H., Fan, D., and Coffey, R. J. (2017) lncRNA MIR100HG-derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/beta-catenin signaling, *Nat. Med.*, **23**, 1331-1341, doi: 10.1038/nm.4424.
120. Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Janakiraman, M., et al. (2012) Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, *Nature*, **486**, 532-536, doi: 10.1038/nature11156.
121. Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., et al. (2015) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients, *Nat. Med.*, **21**, 795-801, doi: 10.1038/nm.3870.
122. Roskoski, R., Jr. (2020) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update, *Pharmacol. Res.*, **152**, 104609, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104609.
123. Yang, J. J., Zhou, C., Huang, Y., Feng, J., Lu, S., Song, Y., Huang, C., Wu, G., Zhang, L., Cheng, Y., Hu, C., Chen, G., Zhang, L., Liu, X., Yan, H. H., Tan, F. L., Zhong, W., and Wu, Y. L. (2017) Icotinib versus whole-brain irradiation in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer and multiple brain metastases (BRAIN): a multicentre, phase 3, open-label, parallel, randomised controlled trial, *Lancet Respir. Med.*, **5**, 707-716, doi: 10.1016/S2213-2600(17)30262-X.
124. Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J. J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E. L., Watkins, C. L., Armour, A. A., and Fukuoka, M. (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma, *N. Engl. J. Med.*, **361**, 947-957, doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
125. Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A. T., Gettinger, S., Cosper, A. K., Akhavanfard, S., Heist, R. S., Temel, J., Christensen, J. G., Wain, J. C., Lynch, T. J., Vernovsky, K., Mark, E. J., Lanuti, M., Iafrate, A. J., Mino-Kenudson, M., and Engelman, J. A. (2011) Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 75ra26, doi: 10.1126/scitranslmed.3002003.
126. Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., and Varmus, H. (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain, *PLoS Med.*, **2**, e73, doi: 10.1371/journal.pmed.0020073.
127. Murtuza, A., Bulbul, A., Shen, J. P., Keshavarzian, P., Woodward, B. D., Lopez-Diaz, F. J., Lippman, S. M., and Husain, H. (2019) Novel third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors and strategies to overcome therapeutic resistance in lung cancer, *Cancer Res.*, **79**, 689-698, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1281.
128. Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B. C., Cheng, Y., Cho, E. K., Voon, P. J., Planchard, D., Su, W. C., Gray, J. E., Lee, S. M., Hodge, R., Marotti, M., Rukazenkov, Y., and Ramalingam, S. S. (2018) Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.*, **378**, 113-125, doi: 10.1056/NEJMoa1713137.
129. Ramalingam, S. S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B. C., Gray, J. E., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., Shah, R., Cobo, M., Lee, K. H., Cheema, P., Tiseo, M., John, T., Lin, M.C., Imamura, F., Kurata, T., Todd, A., Hodge, R., Saggese, M., Rukazenkov, Y., and Soria, J. C. (2020) Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 41-50, doi: 10.1056/NEJMoa1913662.
130. Nagano, T., Tachihara, M., and Nishimura, Y. (2018) Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy, *Cells*, **7**, doi: 10.3390/cells7110212.
131. Li, R., Zhou, X., Yao, H., and Li, L. (2020) Four generations of EGFR TKIs associated with different pathogenic mutations in non-small cell lung carcinoma, *J. Drug Target*, 1-12, doi: 10.1080/1061186X.2020.1737934.
132. Vyse, S., and Huang, P. H. (2019) Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **4**, 5, doi: 10.1038/s41392-019-0038-9.
133. Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A., and Settleman, J. (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways, *Science*, **305**, 1163-1167, doi: 10.1126/science.1101637.
134. Oxnard, G. R., Hu, Y., Mileham, K. F., Husain, H., Costa, D. B., Tracy, P., Feeney, N., Sholl, L. M., Dahlberg, S. E., Redig, A. J., Kwiatkowski, D. J., Rabin, M. S., Paweletz, C. P., Thress, K. S., and Janne, P. A. (2018) Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients

with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib, *JAMA Oncol.*, **4**, 1527-1534, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2969.
135. Piotrowska, Z., Isozaki, H., Lennerz, J. K., Gainor, J. F., Lennes, I. T., Zhu, V. W., Marcoux, N., Banwait, M. K., Digumarthy, S. R., Su, W., Yoda, S., Riley, A. K., Nangia, V., Lin, J. J., Nagy, R. J., Lanman, R. B., Dias-Santagata, D., Mino-Kenudson, M., Iafrate, A. J., Heist, R. S., Shaw, A. T., Evans, E. K., Clifford, C., Ou, S. I., Wolf, B., Hata, A. N., and Sequist, L. V. (2018) Landscape of acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant NSCLC and clinical validation of combined EGFR and RET inhibition with osimertinib and BLU-667 for acquired RET fusion, *Cancer Discov.*, **8**, 1529-1539, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1022.
136. Wang, Q., Yang, S., Wang, K., and Sun, S. Y. (2019) MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer, *J. Hematol. Oncol.*, **12**, 63, doi: 10.1186/s13045-019-0759-9.
137. Terai, H., Soejima, K., Yasuda, H., Nakayama, S., Hamamoto, J., Arai, D., Ishioka, K., Ohgino, K., Ikemura, S., Sato, T., Yoda, S., Satomi, R., Naoki, K., and Betsuyaku, T. (2013) Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC, *Mol. Cancer Res.*, **11**, 759-767, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0652.
138. Schoenfeld, A. J., Chan, J. M., Kubota, D., Sato, H., Rizvi, H., Daneshbod, Y., Chang, J. C., Paik, P. K., Offin, M., Arcila, M. E., Davare, M. A., Shinde, U., Pe'er, D., Rekhtman, N., Kris, M. G., Somwar, R., Riely, G. J., Ladanyi, M., and Yu, H. A. (2020) Tumor analyses reveal squamous transformation and off-target alterations as early resistance mechanisms to first-line osimertinib in EGFR-mutant lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, **26**, 2654-2663, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3563.
139. Zhu, V. W., Klempner, S. J., and Ou, S. I. (2019) Receptor tyrosine kinase fusions as an actionable resistance mechanism to EGFR TKIs in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer, *Trends Cancer*, **5**, 677-692, doi: 10.1016/j.trecan.2019.09.008.
140. Cheng, N., Cai, W., Ren, S., Li, X., Wang, Q., Pan, H., Zhao, M., Li, J., Zhang, Y., Zhao, C., Chen, X., Fei, K., Zhou, C., and Hirsch, F. R. (2015) Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/mTOR pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, **6**, 23582-23593, doi: 10.18632/oncotarget.4361.
141. Lee, J. K., Lee, J., Kim, S., Kim, S., Youk, J., Park, S., An, Y., Keam, B., Kim, D. W., Heo, D. S., Kim, Y. T., Kim, J. S., Kim, S. H., Lee, J. S., Lee, S. H., Park, K., Ku, J. L., Jeon, Y. K., Chung, D. H., Park, P. J., Kim, J., Kim, T. M., and Ju, Y. S. (2017) Clonal history and genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 3065-3074, doi: 10.1200/JCO.2016.71.9096.
142. Heitzer, E., Ulz, P., and Geigl, J. B. (2015) Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer, *Clin. Chem.*, **61**, 112-123, doi: 10.1373/clinchem.2014.222679.
143. Yohe, S., and Thyagarajan, B. (2017) Review of clinical next-generation sequencing, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **141**, 1544-1557, doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
144. Greaves, M., and Maley, C. C. (2012) Clonal evolution in cancer, *Nature*, **481**, 306-313, doi: 10.1038/nature10762.
145. McGranahan, N., and Swanton, C. (2017) Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future, *Cell*, **168**, 613-628, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
146. Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, T. D. (2010) Genomic instability – an evolving hallmark of cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 220-228, doi: 10.1038/nrm2858.
147. Jaramillo, M. L., Leon, Z., Grothe, S., Paul-Roc, B., Abulrob, A., and O'Connor, M. M. (2006) Effect of the anti-receptor ligand-blocking 225 monoclonal antibody on EGF receptor endocytosis and sorting, *Exp. Cell Res.*, **312**, 2778-2790, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.05.008.
148. Liao, H. J., and Carpenter, G. (2009) Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor, *Cancer Res.*, **69**, 6179-6183, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0049.
149. Bhattacharyya, S., Singh, R. D., Pagano, R., Robertson, J. D., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2012) Switching the targeting pathways of a therapeutic antibody by nanodesign, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 1563-1567, doi: 10.1002/anie.201105432.
150. Kim, D. H., Kim, D. K., Zhou, K., Park, S., Kwon, Y., Jeong, M. G., Lee, N. K., and Ryu, S. H. (2017) Single particle tracking-based reaction progress kinetic analysis reveals a series of molecular mechanisms of cetuximab-induced EGFR processes in a single living cell, *Chem. Sci.*, **8**, 4823-4832, doi: 10.1039/c7sc01159h.
151. Tolmachev, V., and Orlova, A. (2020) Affibody molecules as targeting vectors for PET imaging, *Cancers (Basel)*, **12**, doi: 10.3390/cancers12030651.
152. Gцstring, L., Chew, M. T., Orlova, A., Hoiden-Guthenberg, I., Wennborg, A., Carlsson, J., and Frejd, F. Y. (2010) Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: methodological aspects, *Int. J. Oncol.*, **36**, 757-763, doi: 10.3892/ijo_00000551.
153. Genta, I., Chiesa, E., Colzani, B., Modena, T., Conti, B., and Dorati, R. (2017) GE11 peptide as an active targeting agent in antitumor therapy: a minireview, *Pharmaceutics*, **10**, doi: 10.3390/pharmaceutics10010002.
154. Li, N., Nguyen, H. H., Byrom, M., and Ellington, A. D. (2011) Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer, *PLoS One*, **6**, e20299, doi: 10.1371/journal.pone.0020299.
155. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release*, **65**, 271-284, doi: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5.
156. Danhier, F. (2016) To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release*, **244**, 108-121, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.11.015.
157. Golombek, S. K., May, J. N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F., and Lammers, T. (2018) Tumor targeting via EPR: strategies to enhance patient responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **130**, 17-38, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.007.
158. Park, J., Choi, Y., Chang, H., Um, W., Ryu, J. H., and Kwon, I. C. (2019) Alliance with EPR effect: combined strategies to improve the EPR effect in the tumor microenvironment, *Theranostics*, **9**, 8073-8090, doi: 10.7150/thno.37198.
159. Mamot, C., Ritschard, R., Wicki, A., Stehle, G., Dieterle, T., Bubendorf, L., Hilker, C., Deuster, S., Herrmann, R., and Rochlitz, C. (2012) Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study, *Lancet Oncol.*, **13**, 1234-1241, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70476-X.
160. Mamot, C., Drummond, D. C., Noble, C. O., Kallab, V., Guo, Z., Hong, K., Kirpotin, D. B., and Park, J. W. (2005) Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs *in vivo*, *Cancer Res.*, **65**, 11631-11638, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1093.
161. Pan, X., and Lee, R. J. (2007) Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate-folate binding protein affinity,

Int. J. Pharm., **336**, 276-283, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.12.007.
162. Pan, X., Wu, G., Yang, W., Barth, R. F., Tjarks, W., and Lee, R. J. (2007) Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR, *Bioconjug. Chem.*, **18**, 101-108, doi: 10.1021/bc060174r.
163. Vazquez-Becerra, H., Perez-Cardenas, E., Muniz-Hernandez, S., Izquierdo-Sanchez, V., and Medina, L. A. (2017) Characterization and in vitro evaluation of nimotuzumab conjugated with cisplatin-loaded liposomes, *J. Liposome Res.*, **27**, 274-282, doi: 10.1080/08982104.2016.1207665.
164. Petrilli, R., Eloy, J. O., Saggioro, F. P., Chesca, D. L., de Souza, M. C., Dias, M. V. S., daSilva, L. L. P., Lee, R. J., and Lopez, R. F. V. (2018) Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection, *J. Control. Release*, **283**, 151-162, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.05.038.
165. Broekgaarden, M., van Vught, R., Oliveira, S., Roovers, R. C., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Pieters, R. J., Van Gulik, T. M., Breukink, E., and Heger, M. (2016) Site-specific conjugation of single domain antibodies to liposomes enhances photosensitizer uptake and photodynamic therapy efficacy, *Nanoscale*, **8**, 6490-6494, doi: 10.1039/c6nr00014b.
166. Zalba, S., Contreras, A. M., Merino, M., Navarro, I., de Ilarduya, C. T., Troconiz, I. F., Koning, G., and Garrido, M. J. (2016) EGF-liposomes promote efficient EGFR targeting in xenograft colocarcinoma model, *Nanomedicine (Lond.)*, **11**, 465-477, doi: 10.2217/nnm.15.208.
167. Jung, J., Jeong, S. Y., Park, S. S., Shin, S. H., Ju, E. J., Choi, J., Park, J., Lee, J. H., Kim, I., Suh, Y. A., Hwang, J. J., Kuroda, S., Lee, J. S., Song, S. Y., and Choi, E. K. (2015) A cisplatin-incorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity, *Int. J. Oncol.*, **46**, 1268-1274, doi: 10.3892/ijo.2014.2806.
168. Aggarwal, S., Gupta, S., Pabla, D., and Murthy, R. S. (2013) Gemcitabine-loaded PLGA-PEG immunonanoparticles for targeted chemotherapy of pancreatic cancer, *Cancer Nanotechnol.*, **4**, 145-157, doi: 10.1007/s12645-013-0046-3.
169. Wöll, S., Bachran, C., Schiller, S., Schröder, M., Conrad, L., Swee, L. K., and Scherliess, R. (2018) Sortaggable liposomes: evaluation of reaction conditions for single-domain antibody conjugation by Sortase-A and targeting of CD11b(+) myeloid cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **133**, 138-150, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.09.017.
170. Wang, Y. P., Liu, I. J., Chung, M. J., and Wu, H. C. (2020) Novel anti-EGFR scFv human antibody-conjugated immunoliposomes enhance chemotherapeutic efficacy in squamous cell carcinoma of head and neck, *Oral Oncol.*, **106**, 104689, doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104689.
171. Hsu, W. C., Cheng, C. N., Lee, T. W., and Hwang, J. J. (2015) Cytotoxic effects of PEGylated anti-EGFR immunoliposomes combined with doxorubicin and Rhenium-188 against cancer cells, *Anticancer Res.*, **35**, 4777-4788.
172. Haeri, A., Zalba, S., Ten Hagen, T. L., Dadashzadeh, S., and Koning, G. A. (2016) EGFR targeted thermosensitive liposomes: a novel multifunctional platform for simultaneous tumor targeted and stimulus responsive drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **146**, 657-669, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.012.
173. Kim, I. Y., Kang, Y. S., Lee, D. S., Park, H. J., Choi, E. K., Oh, Y. K., Son, H. J., and Kim, J. S. (2009) Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice, *J. Control. Release*, **140**, 55-60, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.07.005.
174. Talelli, M., Oliveira, S., Rijcken, C. J., Pieters, E. H., Etrych, T., Ulbrich, K., van Nostrum, R. C., Storm, G., Hennink, W. E., and Lammers, T. (2013) Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy, *Biomaterials*, **34**, 1255-1260, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.064.
175. Gener, P., Gouveia, L. P., Sabat, G. R., de Sousa Rafael, D. F., Fort, N. B., Arranja, A., Fernandez, Y., Prieto, R. M., Ortega, J. S., Arango, D., Abasolo, I., Videira, M., and Schwartz, S., Jr. (2015) Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells, *Nanomedicine*, **11**, 1883-1892.
176. Kang, S. J., Jeong, H. Y., Kim, M. W., Jeong, I. H., Choi, M. J., You, Y. M., Im, C. S., Song, I. H., Lee, T. S., and Park, Y. S. (2018) Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis, *Nanoscale*, **10**, 19338-19350, doi: 10.1039/c8nr05099f.
177. Mondal, G., Almawash, S., Chaudhary, A. K., and Mahato, R. I. (2017) EGFR-targeted cationic polymeric mixed micelles for codelivery of gemcitabine and miR-205 for treating advanced pancreatic cancer, *Mol. Pharm.*, **14**, 3121-3133, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00355.
178. Kutty, R. V., Chia, S. L., Setyawati, M. I., Muthu, M. S., Feng, S. S., and Leong, D. T. (2015) *In vivo* and *ex vivo* proofs of concept that cetuximab conjugated vitamin E TPGS micelles increases efficacy of delivered docetaxel against triple negative breast cancer, *Biomaterials*, **63**, 58-69, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.005.
179. Jiang, J., Chen, H., Yu, C., Zhang, Y., Chen, M., Tian, S., and Sun, C. (2015) The promotion of salinomycin delivery to hepatocellular carcinoma cells through EGFR and CD133 aptamers conjugation by PLGA nanoparticles, *Nanomedicine (Lond.)*, **10**, 1863-1879, doi: 10.2217/nnm.15.43.
180. Chen, J., Ouyang, J., Chen, Q., Deng, C., Meng, F., Zhang, J., Cheng, R., Lan, Q., and Zhong, Z. (2017) EGFR and CD44 dual-targeted multifunctional hyaluronic acid Nanogels boost protein delivery to ovarian and breast cancers *in vitro* and *in vivo*, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **9**, 24140-24147, doi: 10.1021/acsami.7b06879.
181. Gao, J., Xia, Y., Chen, H., Yu, Y., Song, J., Li, W., Qian, W., Wang, H., Dai, J., and Guo, Y. (2014) Polymer-lipid hybrid nanoparticles conjugated with anti-EGF receptor antibody for targeted drug delivery to hepatocellular carcinoma, *Nanomedicine (Lond.)*, **9**, 279-293, doi: 10.2217/nnm.13.20.
182. Zhai, J., Luwor, R. B., Ahmed, N., Escalona, R., Tan, F. H., Fong, C., Ratcliffe, J., Scoble, J. A., Drummond, C. J., and Tran, N. (2018) Paclitaxel-loaded self-assembled lipid nanoparticles as targeted drug delivery systems for the treatment of aggressive ovarian cancer, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **10**, 25174-25185, doi: 10.1021/acsami.8b08125.
183. Karra, N., Nassar, T., Ripin, A. N., Schwob, O., Borlak, J., and Benita, S. (2013) Antibody conjugated PLGA nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel palmitate: efficacy and biofate in a lung cancer mouse model, *Small*, **9**, 4221-4236, doi: 10.1002/smll.201301417.
184. Sreeranganathan, M., Uthaman, S., Sarmento, B., Mohan, C. G., Park, I. K., and Jayakumar, R. (2017) *In vivo* evaluation of cetuximab-conjugated poly(gamma-glutamic acid)-docetaxel nanomedicines in EGFR-overexpressing gastric cancer xenografts, *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 7165-7182, doi: 10.2147/IJN.S143529.

185. Patel, J., Amrutiya, J., Bhatt, P., Javia, A., Jain, M., and Misra, A. (2018) Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells, *J. Microencapsul.*, **35**, 204-217, doi: 10.1080/02652048.2018.1453560.
186. Wang, J. K., Zhou, Y. Y., Guo, S. J., Wang, Y. Y., Nie, C. J., Wang, H. L., Wang, J. L., Zhao, Y., Li, X. Y., and Chen, X. J. (2017) Cetuximab conjugated and doxorubicin loaded silica nanoparticles for tumor-targeting and tumor microenvironment responsive binary drug delivery of liver cancer therapy, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **76**, 944-950, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.131.
187. Sandoval, M. A., Sloat, B. R., Lansakara, P., Kumar, A., Rodriguez, B. L., Kiguchi, K., Digiovanni, J., and Cui, Z. (2012) EGFR-targeted stearoyl gemcitabine nanoparticles show enhanced anti-tumor activity, *J. Control. Release*, **157**, 287-296, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.08.015.
188. Bouras, A., Kaluzova, M., and Hadjipanayis, C. G. (2015) Radiosensitivity enhancement of radioresistant glioblastoma by epidermal growth factor receptor antibody-conjugated iron-oxide nanoparticles, *J. Neurooncol.*, **124**, 13-22, doi: 10.1007/s11060-015-1807-0.
189. Chen, C. H., Wu, Y. J., and Chen, J. J. (2016) Photo-thermal therapy of bladder cancer with Anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **21**, 1211-1221, doi: 10.2741/4451.
190. El-Sayed, I. H., Huang, X., and El-Sayed, M. A. (2006) Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer Lett.*, **239**, 129-135, doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.035.
191. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Georgiev, G. P., Zalutsky, M. R., and Sobolev, A. S. (2020) Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters, *Nucl. Med. Biol.*, **80-81**, 45-56, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2019.11.005.
192. Li, L., Quang, T. S., Gracely, E. J., Kim, J. H., Emrich, J. G., Yaeger, T. E., Jenrette, J. M., Cohen, S. C., Black, P., and Brady, L. W. (2010) A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme, *J. Neurosurg.*, **113**, 192-198, doi: 10.3171/2010.2.JNS091211.
193. Emrich, J. G., Bender, H., Class, R., Eshleman, J., Miyamoto, C., and Brady, L. W. (1996) In vitro evaluation of iodine-125-labeled monoclonal antibody (MAb 425) in human high-grade glioma cells, *Am. J. Clin. Oncol.*, **19**, 601-608, doi: 10.1097/00000421-199612000-00015.
194. Reilly, R. M., Chen, P., Wang, J., Scollard, D., Cameron, R., and Vallis, K. A. (2006) Preclinical pharmacokinetic, biodistribution, toxicology, and dosimetry studies of 111In-DTPA-human epidermal growth factor: an Auger electron-emitting radiotherapeutic agent for epidermal growth factor receptor-positive breast cancer, *J. Nucl. Med.*, **47**, 1023-1031.
195. Panosa, C., Fonge, H., Ferrer-Batalle, M., Menendez, J. A., Massaguer, A., De Llorens, R., and Reilly, R. M. (2015) A comparison of non-biologically active truncated EGF (EGFt) and full-length hEGF for delivery of Auger electron-emitting 111In to EGFR-positive breast cancer cells and tumor xenografts in athymic mice, *Nucl. Med. Biol.*, **42**, 931-938, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2015.08.003.
196. Vallis, K. A., Reilly, R. M., Scollard, D., Merante, P., Brade, A., Velauthapillai, S., Caldwell, C., Chan, I., Freeman, M., Lockwood, G., Miller, N. A., Cornelissen, B., Petronis, J., and Sabate, K. (2014) Phase I trial to evaluate the tumor and normal tissue uptake, radiation dosimetry and safety of (111)In-DTPA-human epidermal growth factor in patients with metastatic EGFR-positive breast cancer, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **4**, 181-192.
197. Cornelissen, B., Waller, A., Able, S., and Vallis, K. A. (2013) Molecular radiotherapy using cleavable radioimmunoconjugates that target EGFR and gammaH2AX, *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 2472-2482, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0369.
198. Rosenkranz, A. A., Ulasov, A. V., Slastnikova, T. A., Khramtsov, Y. V., and Sobolev, A. S. (2014) Use of intracellular transport processes for targeted drug delivery into a specified cellular compartment, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 928-946, doi: 10.1134/S0006297914090090.
199. Sobolev, A. S. (2009) Modular nanotransporters of anticancer drugs conferring cell specificity and higher efficiency, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1567-1574, doi: 10.1134/s0006297909130094.
200. Sobolev, A. S., Aliev, R. A., and Kalmykov, S. N. (2016) Radionuclides emitting short-range particles and modular nanotransporters for their delivery to target cancer cells, *Rus. Chem. Rev.*, **85**, 1011-1032.
201. Sobolev, A. S. (2018) Modular nanotransporters for nuclear-targeted delivery of Auger electron emitters, *Front. Pharmacol.*, **9**, 952, doi: 10.3389/fphar.2018.00952.
202. Gilyazova, D. G., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Lunin, V. G., Sergienko, O. V., Khramtsov, Y. V., Timofeyev, K. N., Grin, M. A., Mironov, A. F., Rubin, A. B., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2006) Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters, *Cancer Res.*, **66**, 10534-10540, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2393.
203. Slastnikova, T. A., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Schiffelers, R. M., Lupanova, T. N., Khramtsov, Y. V., Zalutsky, M. R., and Sobolev, A. S. (2012) Modular nanotransporters: a multipurpose *in vivo* working platform for targeted drug delivery, *Int. J. Nanomed.*, **7**, 467-482, doi: 10.2147/IJN.S28249.
204. Slastnikova, T. A., Koumarianou, E., Rosenkranz, A. A., Vaidyanathan, G., Lupanova, T. N., Sobolev, A. S., and Zalutsky, M. R. (2012) Modular nanotransporters: a versatile approach for enhancing nuclear delivery and cytotoxicity of Auger electron-emitting 125I, *EJNMMI Res.*, **2**, 59, doi: 10.1186/2191-219X-2-59.
205. Koumarianou, E., Slastnikova, T. A., Pruszynski, M., Rosenkranz, A. A., Vaidyanathan, G., Sobolev, A. S., and Zalutsky, M. R. (2014) Radiolabeling and *in vitro* evaluation of (67)Ga-NOTA-modular nanotransporter – a potential Auger electron emitting EGFR-targeted radiotherapeutic, *Nucl. Med. Biol.*, **41**, 441-449, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.03.026.
206. Slastnikova, T. A., Rosenkranz, A. A., Morozova, N. B., Vorontsova, M. S., Petriev, V. M., Lupanova, T. N., Ulasov, A. V., Zalutsky, M. R., Yakubovskaya, R. I., and Sobolev, A. S. (2017) Preparation, cytotoxicity, and *in vivo* antitumor efficacy of (111)In-labeled modular nanotransporters, *Int. J. Nanomed.*, **12**, 395-410, doi: 10.2147/IJN.S125359.
207. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Karmakova, T. A., Vorontsova, M. S., Morozova, N. B., Petriev, V. M., Abrosimov, A. S., Khramtsov, Y. V., Lupanova, T. N., Ulasov, A. V., Yakubovskaya, R. I., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2018) Antitumor activity of Auger electron emitter ^{111}In delivered by modular nanotransporter for treatment of bladder cancer with EGFR overexpression, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1331, doi: 10.3389/fphar.2018.01331.
208. Karyagina, T. S., Ulasov, A. V., Slastnikova, T. A., Rosenkranz, A. A., Lupanova, T. N., Khramtsov, Y. V., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2020) Targeted delivery of ^{111}In into the nuclei of EGFR overexpressing cells via modular nanotransporters with anti-EGFR affibody, *Front. Pharmacol.*, **11**, 176, doi: 10.3389/fphar.2020.00176.

209. Li, S., Goins, B., Hrycushko, B. A., Phillips, W. T., and Bao, A. (2012) Feasibility of eradication of breast cancer cells remaining in postlumpectomy cavity and draining lymph nodes following intracavitary injection of radioactive immunoliposomes, *Mol. Pharm.*, **9**, 2513-2522, doi: 10.1021/mp300132f.
210. Song, H., Hedayati, M., Hobbs, R. F., Shao, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Deweese, T. L., and Sgouros, G. (2013) Targeting aberrant DNA double-strand break repair in triple-negative breast cancer with alpha-particle emitter radiolabeled anti-EGFR antibody, *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 2043-2054, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0108.
211. Pfost, B., Seidl, C., Autenrieth, M., Saur, D., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Schwaiger, M., and Senekowitsch-Schmidtke, R. (2009) Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice, *J. Nucl. Med.*, **50**, 1700-1708, doi: 10.2967/jnumed.109.065961.
212. Fazel, J., Rotzer, S., Seidl, C., Feuerecker, B., Autenrieth, M., Weirich, G., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., and Senekowitsch-Schmidtke, R. (2015) Fractionated intravesical radioimmunotherapy with ^{213}Bi-anti-EGFR-MAb is effective without toxic side-effects in a nude mouse model of advanced human bladder carcinoma, *Cancer Biol. Ther.*, **16**, 1526-1534, doi: 10.1080/15384047.2015.1071735.
213. Autenrieth, M. E., Seidl, C., Bruchertseifer, F., Horn, T., Kurtz, F., Feuerecker, B., D'Alessandria, C., Pfob, C., Nekolla, S., Apostolidis, C., Mirzadeh, S., Gschwend, J. E., Schwaiger, M., Scheidhauer, K., and Morgenstern, A. (2018) Treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder with an alpha-emitter immunoconjugate targeting the epidermal growth factor receptor: a pilot study, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **45**, 1364-1371, doi: 10.1007/s00259-018-4003-6.
214. Milenic, D. E., Baidoo, K. E., Kim, Y. S., and Brechbiel, M. W. (2015) Evaluation of cetuximab as a candidate for targeted alpha-particle radiation therapy of HER1-positive disseminated intraperitoneal disease, *MAbs*, **7**, 255-264, doi: 10.4161/19420862.2014.985160.
215. Zidenberg-Cherr, S., Parks, N. J., and Keen, C. L. (1987) Tissue and subcellular distribution of bismuth radiotracer in the rat: considerations of cytotoxicity and microdosimetry for bismuth radiopharmaceuticals, *Radiat. Res.*, **111**, 119-129.
216. Rosenkranz, A. A., Vaidyanathan, G., Pozzi, O. R., Lunin, V. G., Zalutsky, M. R., and Sobolev, A. S. (2008) Engineered modular recombinant transporters: application of new platform for targeted radiotherapeutic agents to alpha-particle emitting 211 At, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **72**, 193-200, doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.05.055.
217. Simon, N., and FitzGerald, D. (2016) Immunotoxin therapies for the treatment of epidermal growth factor receptor-dependent cancers, *Toxins (Basel)*, **8**, doi: 10.3390/toxins8050137.
218. Yang, Y., Tian, Z., Ding, Y., Li, X., Zhang, Z., Yang, L., Zhao, F., Ren, F., and Guo, R. (2018) EGFR-targeted immunotoxin exerts antitumor effects on esophageal cancers by increasing ROS accumulation and inducing apoptosis via inhibition of the Nrf2-Keap1 pathway, *J. Immunol. Res.*, **2018**, 1090287, doi: 10.1155/2018/1090287.
219. Deng, C., Xiong, J., Gu, X., Chen, X., Wu, S., Wang, Z., Wang, D., Tu, J., and Xie, J. (2017) Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency *in vitro*, *Oncotarget*, **8**, 38568-38580, doi: 10.18632/oncotarget.16930.
220. Kim, J. S., Jun, S. Y., and Kim, Y. S. (2020) Critical issues in the development of immunotoxins for anticancer therapy, *J. Pharm. Sci.*, **109**, 104-115, doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.037.
221. Sampson, J. H., Akabani, G., Archer, G. E., Berger, M. S., Coleman, R. E., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Greer, K., Herndon, J. E., Kunwar, S., McLendon, R. E., Paolino, A., Petry, N. A., Provenzale, J. M., Reardon, D. A., Wong, T. Z., Zalutsky, M. R., Pastan, I., and Bigner, D. D. (2008) Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors, *Neuro Oncol.*, **10**, 320-329, doi: 10.1215/15228517-2008-012.
222. Chandramohan, V., Pegram, C. N., Piao, H., Szafranski, S. E., Kuan, C. T., Pastan, I. H., and Bigner, D. D. (2017) Production and quality control assessment of a GLP-grade immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, for a phase I/II clinical trial, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 2747-2766, doi: 10.1007/s00253-016-8063-x.
223. Zalutsky, M. R., Boskovitz, A., Kuan, C. T., Pegram, C. N., Ayriss, J., Wikstrand, C. J., Buckley, A. F., Lipp, E. S., Herndon, J. E., McLendon, R. E., and Bigner, D. D. (2012) Radioimmunotargeting of malignant glioma by monoclonal antibody D2C7 reactive against both wild-type and variant III mutant epidermal growth factor receptors, *Nucl. Med. Biol.*, **39**, 23-34, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2011.06.005.
224. Chandramohan, V., Bao, X., Keir, S. T., Pegram, C. N., Szafranski, S. E., Piao, H., Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Kuan, C. T., Pastan, I. H., and Bigner, D. D. (2013) Construction of an immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, targeting EGFRwt and EGFRvIII for brain tumor therapy, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 4717-4727, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3891.
225. Chandramohan, V., Bao, X., Yu, X., Parker, S., McDowall, C., Yu, Y. R., Healy, P., Desjardins, A., Gunn, M. D., Gromeier, M., Nair, S. K., Pastan, I. H., and Bigner, D. D. (2019) Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations, *J. Immunother. Cancer*, **7**, 142, doi: 10.1186/s40425-019-0614-0.
226. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., and Golab, J. (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.*, **61**, 250-281, doi: 10.3322/caac.20114.
227. Liang, H., Shin, D. S., Lee, Y. E., Nguyen, D. C., Trang, T. C., Pan, A. H., Huang, S. L., Chong, D. H., and Berns, M. W. (1998) Subcellular phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid (ALA), *Lasers Surg. Med.*, **22**, 14-24, doi: 10.1002/(sici)1096-9101(1998)22:1<14::aid-lsm6>3.0.co;2-#.
228. Rosenkranz, A. A., Jans, D. A., and Sobolev, A. S. (2000) Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency, *Immunol. Cell. Biol.*, **78**, 452-464, doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00925.x.
229. Gilyazova, D. G., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Lunin, V. G., Sergienko, O. V., Grin, M. A., Mironov, A. F., Rubin, A. B., and Sobolev, A. S. (2006) Recombinant modular transporters on the basis of epidermal growth factor for targeted intracellular delivery of photosensitizers, *Curr. Res. Laser Use Oncol.: 2000-2004*, **5973**, 59730E, doi: 10.1117/12.640049.
230. Gillenwater, A. M., Johnson, J. M., Curry, J. M., Kochuparambil, S. T., McDonald, D., Fidler, M., Stenson, K. M., Vasan, N. R., Razaq, M. A., and Campana, J. (2020) Survival following photoimmunotherapy in patients (Pts) with recurrent head and neck squamous cell carcinoma (rHNSCC), *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106**, 1180-1180.
231. Fernandes, S. R. G., Fernandes, R., Sarmento, B., Pereira, P. M. R., and Tome, J. P. C. (2019) Photoimmunocon-

jugates: novel synthetic strategies to target and treat cancer by photodynamic therapy, *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 2579-2593, doi: 10.1039/c8ob02902d.
232. Harvey, T. J., Burdon, D., Steele, L., Ingram, N., Hall, G. D., Selby, P. J., Vile, R. G., Cooper, P. A., Shnyder, S. D., and Chester, J. D. (2010) Retargeted adenoviral cancer gene therapy for tumour cells overexpressing epidermal growth factor receptor or urokinase-type plasminogen activator receptor, *Gene Ther.*, **17**, 1000-1010, doi: 10.1038/gt.2010.45.
233. Urnauer, S., Muller, A. M., Schug, C., Schmohl, K. A., Tutter, M., Schwenk, N., Rodl, W., Morys, S., Ingrisch, M., Bertram, J., Bartenstein, P., Clevert, D. A., Wagner, E., and Spitzweg, C. (2017) EGFR-targeted nonviral NIS gene transfer for bioimaging and therapy of disseminated colon cancer metastases, *Oncotarget*, **8**, 92195-92208, doi: 10.18632/oncotarget.21028.
234. Liang, Y., Peng, J., Li, N., Yu-Wai-Man, C., Wang, Q., Xu, Y., Wang, H., Tagalakis, A. D., and Du, Z. (2019) Smart nanoparticles assembled by endogenous molecules for siRNA delivery and cancer therapy via CD44 and EGFR dual-targeting, *Nanomedicine*, **15**, 208-217, doi: 10.1016/j.nano.2018.09.018.
235. Bagley, S. J., and O'Rourke, D. M. (2020) Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: lessons learned and future directions, *Pharmacol. Ther.*, **205**, 107419, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107419.
236. Westphal, M., Maire, C. L., and Lamszus, K. (2017) EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise, *CNS Drugs*, **31**, 723-735, doi: 10.1007/s40263-017-0456-6.
237. Xu, M. J., Johnson, D. E., and Grandis, J. R. (2017) EGFR-targeted therapies in the post-genomic era, *Cancer Metastasis Rev.*, **36**, 463-473, doi: 10.1007/s10555-017-9687-8.
238. Slastnikova, T. A., Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., and Sobolev, A. S. (2018) Targeted intracellular delivery of antibodies: the state of the Art, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1208, doi: 10.3389/fphar.2018.01208.
239. Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., and Sobolev, A. S. (2018) Transcription factors: time to deliver, *J. Control. Release*, **269**, 24-35, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.004.
240. Jin, J. O., Kim, G., Hwang, J., Han, K. H., Kwak, M., and Lee, P. C. W. (2020) Nucleic acid nanotechnology for cancer treatment, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1874**, 188377, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188377.

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR: KEY TO SELECTIVE INTRACELLULAR DELIVERY*

Review

A. A. Rosenkranz[1,2] and T. A. Slastnikova[2]**

[1] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: aar@igb.ac.ru*

[2] *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Received June 15, 2020
Revised July 23, 2020
Accepted July 23, 2020

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is an integral surface protein mediating cellular response to a number of growth factors. Its overexpression and increased activation due to mutations is one of the most common traits of many types of cancer. Development and clinical use of the agents, which block EGFR activation, became a prime example of the personalized targeted medicine. However, despite the obvious success in this area, cancer cure remains unattainable in most cases. Because of that, as well as the result of the search for possible ways to overcome the difficulties of treatment, a huge number of new treatment methods relying on the use of EGFR overexpression and its changes to destroy cancer cells. Modern data on the structure, functioning, and intracellular transport of EGFR, its natural ligands, as well as signaling cascades triggered by the EGFR activation, peculiarities of the EGFR expression and activation in oncological disorders, as well as applied therapeutic approaches aimed at blocking EGFR signaling pathway are summarized and analyzed in this review. Approaches to the targeted delivery of various chemotherapeutic agents, radionuclides, immunotoxins, photosensitizers, as well as the prospects for gene therapy aimed at cancer cells with EGFR overexpression are reviewed in detail. It should be noted that increasing attention is being paid nowadays to the development of multifunctional systems, either carrying several different active agents, or possessing several environment-dependent transport functions. Potentials of the systems based on receptor-mediated endocytosis of EGFR and their possible advantages and limitations are discussed.

Keywords: epidermal growth factor receptor, overexpression, endocytosis, cancer, targeted cancer therapy, drug delivery

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1189 – 1212

УДК 57 (091)

ИСТОРИЯ РАННИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БАКТЕРИОФАГОВ И РОЖДЕНИЕ ОСНОВНЫХ КОНЦЕПЦИЙ ВИРУСОЛОГИИ

Обзор

© 2020 А.В. Летаров[1,2]

[1] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312 Москва, Россия; электронная почта: letarov@gmail.com*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 06.07.2020
После доработки 02.08.2020
Принята к публикации 02.08.2020

Вирусы бактерий – бактериофаги – были открыты спустя более 20 лет после открытия вирусов растений и животных, однако именно исследования бактериофагов в течение первых 40 лет их изучения привели к созданию современной концепции вируса и в большой мере легли в основание зарождающихся молекулярной генетики и молекулярной биологии. Отдельные аспекты истории ранних исследований бактериофагов хорошо описаны в специальных работах. В этом обзоре дается общая картина ключевых событий, приведших к созданию основных концепций вирусологии. В частности, рассмотрены противостояние идей Ф. д'Эрелля и Ж. Бордэ по вопросу о природе бактериофага, история открытия явления лизогении и установления природы, работы фаговой группы, созданной М. Дельбрюком в США, создание методологии генетического анализа бактериофагов и другие исследования, приведшие к пониманию вируса (бактериофага) как трансмиссивной генетической программы. Также рассмотрена история первых попыток практического применения бактериофагов, таких, как фаговая терапия и фаготипирование.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, история исследований, открытие бактериофагов, Фаговая группа, открытие лизогении, история фаговой терапии.

DOI: 10.31857/S0320972520090031

Для многих молодых ученых будущее гораздо важнее прошлого, и история науки начинается завтра.
<однако>
Не стоит недооценивать опасность парашютирования молодых энтузиастов науки прямо на цветущую поляну тщательно отобранных данных и полностью распустившихся концепций.

Андре Львов, 1953 г.

ВВЕДЕНИЕ

Биология бактериофагов занимает особое место в истории биологической науки 20 столетия. Начавшись чуть более столетия назад, исследования в этой области привели к созданию первой достаточно универсальной и безопасной технологии этиотропной терапии бактериальных инфекций, первой технологии высокоразрешающего типирования штаммов бактерий, позволили раскрыть природу вирусной инфекции как явления и в значительной мере стали основанием для раскрытия молекулярных механизмов наследственности. Различные аспекты «романтического» периода первых десятилетий исследований фагов, когда был осуществлен прорыв к совершенно новой концептуальной базе биологической науки, достаточно подробно исследованы и стали темой многочисленных обзоров, в том числе процитированных в этой статье. Особое место среди них занимает вводная глава Stent [1] к сборнику подобранных

Принятые сокращения: ФТ – фаговая терапия.

им ключевых публикаций по биологии бактериофагов, вышедшему в 1960 г., в которой он дает подробный обзор истории развития данной области. В этих работах были предприняты интересные попытки реконструкции процесса, формирования концепции вируса как трансмиссивной генетической программы, причины успехов и неудач различных фаговых технологий, наиболее известной из которых является фаговая терапия. К сожалению, однако, действующие исследователи и преподаватели биологических дисциплин зачастую не имеют возможности посвятить много времени изучению частных аспектов истории биологии бактериофагов. Кроме того, работа с существующим историографическим материалом требует весьма специальной подготовки (особенно это относится к процитированной работе Stent [1]), что осложняет восприятие написанного более широким кругом читателей, не занимающихся профессионально биологией бактериофагов.

Принципиальное значение здесь имеет также тот факт, что методологическая парадигма современной микробиологии драматически отличается от методов науки 1920–1950-х гг. Если в современной науке стандартом качества является получение прямых доказательств и непосредственной визуализации изучаемых явлений и объектов, то в науке того периода обычным было основывать выводы на многоступенчатых косвенных построениях, которые не были бы восприняты рецензентами современных журналов как достаточно убедительные. Тем не менее именно такие подходы, требовавшие большого объема лабораторной работы и огромных интеллектуальных усилий при планировании исследований и анализе полученных данных, в итоге привели к созданию важнейших концепций биологии – концепции вируса как трансмиссивной генетической программы, а также основных постулатов молекулярной биологии.

Все это побудило автора постараться создать интегрирующее описание истории первых 40 лет развития биологии вирусов бактерий в относительно компактной форме, фокусируя свое внимание не столько на формальной историографии, сколько на воссоздании хода творческого процесса у ключевых исследователей и научных групп того времени. Первая попытка решить эту задачу была предпринята автором в соответствующей главе недавно вышедшей книги «Современные концепции биологии бактериофагов» [2]. В настоящей работе автор постарался дать более точное описание отдельных проблем, событий и персоналий в рамках очерченной области, одновременно приведя обзор существующих исторических работ.

СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКИ НАКАНУНЕ ОТКРЫТИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Первые сообщения об открытии талантливым голландским оптиком-самоучкой и исследователем микроскопистом Антони ван Левенгуком целого мира мельчайших живых существ, позднее названных микроорганизмами, датируются 1674 г. Это были одни из первых писем Левенгука Королевскому обществу в Лондоне [3]. Тем не менее микробиология, как самостоятельная отрасль биологической науки, обладающая своей методологией и теоретическими концепциями, была создана лишь во второй половине XIX века, в первую очередь благодаря пионерским работам Луи Пастера. Этот ученый заложил основы большинства главных направлений науки о микробах: физиологии и биохимии микроорганизмов, технической микробиологии, медицинской микробиологии и вакцинологии [3, 4]. Окончательный же триумф бактериологических методов в медицине и в ряде иных дисциплин стал возможен в результате деятельности немецкого микробиолога Роберта Коха, создавшего вместе со своими сотрудниками основы современной методологии работы с бактериальными культурами, которые остаются актуальными и поныне [3, 5]. Микробиологи школ Коха и Пастера, а также их последователи по всему миру в течение короткого времени (1876–1912 гг.) выделили и описали более 25 возбудителей различных бактериальных инфекций [3, 6]. В это же время благодаря работам Пастера и его школы, а также ряда первых иммунологов, стали доступны вакцины против целого ряда опасных заболеваний. Появились также первые лечебные токсин-нейтрализующие сыворотки, в том числе дифтерийная [7, 8] и чумная [9]. В клиническую практику вошла бактериологическая диагностика. Создаются специальные лаборатории для производства лечебных сывороток и вакцин, которые требовали наработки большого количества биомассы бактерий, например для получения соответствующих токсинов в количестве, достаточном для иммунизации животных. В частности, в России производство вакцин и сывороток было налажено при Императорском Институте экспериментальной медицины (ИИЭМ), а с 1900 г. все работы по особо опасным инфекциям проводились в лаборатории «Чумного форта» (один из старых морских фортов Кронштадта, который утратил военное значение и был реконструирован под «Особую лабораторию ИИЭМ по заготовлению противочумных препаратов на форте Александр I») [10].

Несмотря на высокий технический уровень науки о микробах и добытые обширные знания о разнообразии микроорганизмов, понимание того, что за сущность представляет из себя микроб, в это время лишь выкристаллизовывалось. Так, в микробиологии конца XIX – начала XX веков воспринимали в качестве организмов не столько клетки, сколько лабораторные культуры бактерий. Изменения в сознании исследователей, поставившие отдельную клетку в центр концепции микроорганизма, стали происходить лишь в 1920-е гг. Несмотря на то что идеи использования бактерий, как модельных объектов генетики, уже высказывались некоторыми учеными [11, 12], большинство микробиологов той эпохи понимало под наследственным аппаратом бактерий скорее выражение биохимического гомеостаза, отрицая возможность присутствия у них генов, аналогичных генам высших организмов [12].

Первые вирусы растений и животных были также открыты в конце XIX века. Это были вирус табачной мозаики, описанный в 1892 г. Ivanovski [13] и вирус ящура, открытый в 1898 г. Loeffler и Frosch [14]. Эти авторы продемонстрировали, что патогенные агенты, вызывающие данные заболевания, способны проникать сквозь фарфоровые бактериальные фильтры. Поэтому Д.И. Ивановским был предложен термин «фильтрующийся вирус», который использовался в литературе в течение длительного времени. Для становления первоначальных представлений о вирусах, качественно отличавших их от бактерий, существенную роль имели также работы М. Бейеринка (см. обзор van Kammen [11]), который установил способность вируса табачной мозаики диффундировать в агар. Это позволило ему сформулировать концепцию *contagium vivum fluidum* – жидкого инфекционного агента, в противоположность бактериальным патогенам, которые он определил как *contagium vivum fixum*. Бейеринк считал, что этот агент для размножения должен попасть в живую клетку.

В докторской диссертации Ивановского также описаны опыты по диффузии возбудителя табачной мозаики в агар с использованием в качестве контрольного объекта частичек туши, что позволило ему настаивать на предположении о корпускулярной природе инфекционного агента (Докторская диссертация Д.И. Ивановского «Мозаичная болезнь табака», [15, 16]). В ходе научной дискуссии между Ивановским и Бейеринком ([16] и ссылки в этой работе) М. Бейеринк признал приоритет Ивановского в открытии фильтрующегося инфекционного агента. Таким образом, Д.И. Ивановский был, очевидно, первым автором, описавшим вирус и сделавшим обоснованное предположение о его корпускулярной природе. М. Бейеринку, вероятно, принадлежит приоритет формулировки гипотезы о том, что для размножения вируса необходима живая клетка хозяина (в данном случае – растения).

Еще несколько возбудителей вирусных заболеваний людей, животных и растений были открыты в последующее десятилетие. Тем не менее физическая природа *contagium vivum fluidum* оставалась полностью неизвестной. Под словом «вирус» подразумевали не обязательно агент корпускулярной природы. Это могло быть, по мнению ученых того времени, и растворимое вещество, обладавшее одновременно патогенным действием и способностью стимулировать собственную продукцию в клетках зараженного организма, таким образом размножаясь (см. ниже). В силу этих причин восприятие концепции ультрамикроскопического неклеточного организма, которая как теперь кажется, была наиболее логичной интерпретацией имевшихся на том этапе экспериментальных результатов, происходило с большим трудом.

Без сомнения, в процессе микробиологической работы в лабораториях того времени неоднократно сталкивались и с действием бактериофагов. Как мы теперь знаем, эти вирусы практически вездесущи и часто являются причиной затруднений в выращивании жидких культур даже в современной лабораторной практике [17]. Спонтанный лизис бактериальных культур, безусловно, часто наблюдался микробиологами того времени, что интерпретировалось как явление автолиза (который действительно может иметь место и без всякого участия вирусов). Литература того времени, посвященная автолизу, достаточно обширна, но ни один из авторов не высказывал предположения об инфекционном агенте, поражающем бактерии. В своем обзоре Abedon et al. [18] приводят 30 ссылок на научные статьи, вышедшие до 1917 г., которые могли бы считаться кандидатами в «предысторические» описания активности бактериофагов.

Наиболее ранняя из этих работ, которая часто упоминается в качестве предтечи первых описаний бактериофагов – это статья британского химика и микробиолога Эрнста Ханбери Ганкина (Ernest Hanbury Hankin; 1865–1939), который в 1898 г. сообщил о литическом действии профильтрованной через бактериальные фильтры воды индийских рек Ганг и Джумна по отношению к культурам возбудителя холеры [19]. Поскольку это действие уничтожалось прогреванием воды, Hankin сделал вывод, что оно вызвано летучим бактерицидным вещест-

вом. Впоследствии это заключение воспринималось большинством историков как досадная ошибка, сделанная от недостатка проницательности и не позволившая Ганкину развить свои исследования и первым описать вирусы, поражающие бактерий. Однако тщательное изучение работы Hankin позволило Abedon et al. [18] предположить, что описанное им явление, скорее всего, действительно не относится к бактериофагии. В работе Hankin имеются указания на то, что прогревание воды в плотно закрытых пробирках не вызывало инактивации литического начала. Кроме того, скорость гибели культур холерного вибриона под действием воды была настолько высока, что для этого потребовалась концентрация специфического холерного фага порядка 10^6–10^7 частиц в 1 мл, что для речной воды маловероятно.

Один из основателей отечественной микробиологии Николай Федорович Гамалея (1859–1949) описывал автолиз культур *Baclillus anthracis* [20, 21]. Гамалея выделил из лизата некое вещество путем его осаждения уксусной кислотой и перерастворения в аммиаке (к сожалению, детали этой процедуры в его работе отсутствуют). Это вещество было, как считал Гамалея, литическим ферментом. Действие данного фермента было достаточно специфичным – он хорошо лизировал клетки *B. anthracis* и не действовал или действовал очень слабо на другие микроорганизмы. Наиболее интересным было то, что действие «литического фермента» было трансмиссивным, т.е. из лизированной этим препаратом культуры можно было приготовить новую порцию агента, обладавшего такой же активностью и т.д. Несмотря на неполноту описания экспериментов (что было вполне в традиции научных публикаций того времени) можно заключить, что с высокой долей вероятности Н.Ф. Гамалея действительно имел дело с бактериофагом *B. anthracis*, но в своей интерпретации полученных данных ограничился только чисто биохимическим механизмом, не высказав никаких предположений о возможном действии живого инфекционного агента.

Таким образом, приходится признать, что воздействие бактериофагов, которое неизбежно должно было наблюдаться ранними микробиологами достаточно часто, практически не нашло отражения в научной литературе того времени. По-видимому, фаговый лизис культур обычно воспринимался как методическое нарушение, которое заставляло экспериментаторов просто повторять неудачные опыты более тщательно вместо того, чтобы искать причину произошедшего эффекта.

ОТКРЫТИЕ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ

Первое бесспорное описание вирусной инфекции у бактерий принадлежит Фредерику Уильяму Туорту (Frederik William Twort; 1877–1950). Этот ученый, работавший в Брауновском ветеринарном институте в Лондоне, ставил эксперименты, имевшие своей целью выращивание на бесклеточных питательных средах разнообразных фильтрующихся вирусов, в том числе вируса осповакцины. Ранее Туорт достиг значительного успеха, научившись культивировать возбудителя проказы, а затем возбудителя болезни Джонса (воспалительное заболевание кишечника жвачных животных, вызываемое *Mycobacterium avium* подвид *paratuberculosis*), добавляя к средам экстракт бактерий *M. tuberculosis,* культивирование которых было налажено еще Робертом Кохом. Впоследствии было выяснено, что фактором роста, который содержался в биомассе возбудителя туберкулеза, был витамин K [22]. Будучи вдохновлен этим успехом, Туорт предположил, что вирусы могут быть сродни паразитическим бактериям, которые приобрели крайне сложные питательные потребности. Он рассчитывал, что в отличие от паразитических вирусов, существуют и свободноживущие их формы, которые могут быть проще в культивировании. Параллельно с попытками выделения таких свободноживущих вирусов из разного природного материала Туорт попробовал также вырастить вирус осповакцины из препарата вакцины, которую в те времена получали культивированием вируса коровьей оспы на коже животных, вследствие чего препараты часто бывали контаминированы различными бактериями.

На чашках с посевами осповакцины Туорт обнаружил колонии «желтых и белых микрококков» (вероятнее всего *Staphylococcus*), которые, очевидно, были контаминацией. Однако он обратил внимание на то, что часть колоний были полупрозрачными и имели консистенцию, отличную от нормальных колоний. Туорт установил, что в стекловидных колониях живых клеток стрептококков почти нет, а вместо них имеются мелкие частицы, по-видимому, обломки клеток, не дающие роста при пересеве. В то же время материал из стекловидных колоний, перенесенный на свежие колонии, вызывал их «стекловидную трансформацию» (необходимо отметить, что это довольно редкое явление для бактериофагов – обычно действие этих вирусов невозможно заметить на уже выросших колониях, для этого требуется произвести заражение в начале их развития; это дало в дальнейшем д'Эреллю основание сомневаться в том, что феномен Туорта идентичен описанной им бактери-

офагии), но наибольшей активностью агент Туорта обладал против молодых активно растущих культур. Для фильтрации материала Туорт предварительно разбавлял его водой в 1 миллион раз. Нанося такой фильтрат на засеянные микрококками пробирки со скошенным агаром, он наблюдал образование на штрихе бактерий прозрачных пятен, количество которых зависело от степени разведения материала. Все эти результаты были опубликованы в статье, вышедшей в журнале *Lancet* в 1915 г. [23]. В этой работе Туорт высказал осторожное предположение, что изученное им явление – результат действия вируса, поражающего бактерии, однако посчитал, что окончательно разрешить вопрос не представляется возможным, поскольку о природе вирусов ничего не известно. Обсуждая возможные гипотезы, Туорт высказывает мнение, что его агент может быть ультрамикроскопическим организмом, сродни бактерии или амёбе (!), однако тут же замечает: «... необходимо помнить, что если мир живого был медленно построен в соответствии с теориями эволюции, то амёба и бактерия должны быть признаны высокоразвитыми организмами в сравнении с намного более примитивными формами, которые существовали и, возможно, продолжают существовать в наши дни. Вполне возможно, что ультрамикроскопический вирус лежит где-то в огромном поле жизни, более низко организованной, чем бактерия и амёба. Это может быть живая протоплазма, не образующая определенных индивидуумов или фермент, обладающий способностью к росту».

Более того, в своей короткой статье Туорт описывает вторичный рост бактериальной культуры после фагового лизиса (видимо, за счет образования устойчивых мутантов), а также явление стабильно перевиваемой ассоциации бактериальной культуры и вируса, которая, несмотря на множественные пассажи обладает способностью формировать пятна «стекловидной трансформации» (т.е. фаговые бляшки). Это «спонтанное проявление разрушительного начала» представляется Туорту интересным с позиции объяснения природы рака.

Таким образом, в одной короткой статье талантливого британского микробиолога имеется не только сообщение об открытии фильтруюшегося вируса бактерий, но и довольно успешная попытка найти ему место в общебиологической картине мира, предвосхитившая одну из современных теорий возникновения вирусов, считающую их реликтами доклеточного этапа биогенеза [24].

К сожалению, Ф. Туорт не имел возможности продолжить исследования обнаруженного им феномена из-за сложностей военного времени и финансовых затруднений. Он был вынужден поступить на военную службу. Капитан Туорт служил в военно-медицинской лаборатории в Салониках до 1917 г., однако его отношения с военным начальством не сложились, поэтому он не стал продлевать контракт и вернулся в Англию. Тем не менее после войны Туорт не пожелал присоединиться к исследованию открытых им вирусов бактерий, однако продолжил изыскания в попытках найти способ культивировать вирусы на бесклеточных средах [25], очевидно, не имевшие успеха. В результате работа Туорта 1915 г., которая по своему содержанию вполне могла бы претендовать на роль отправной точки развития современной вирусологии, не была замечена научной общественностью, и его формальный приоритет в открытии бактериофагов был установлен лишь позднее.

Честь «окончательного» открытия вирусов бактерий, равно как и авторство термина «бактериофаг», или сокращенно «фаг», принадлежит канадско-французскому ученому Феликсу д'Эреллю (Félix d'Herelle; 1873–1949). Бурная биография Феликса д'Эрелля, который, не имея высшего образования, оставил весьма яркий след в биологической науке, сама по себе представляет существенный интерес. К сожалению, за неимением места мы не можем пересказать ее здесь и адресуем читателя к мемуарам д'Эрелля, недавно опубликованным Dublanchet [26], а также к работе Summers [27]. Достаточно точное краткое описание его биографии можно также найти в соответствующей статье Википедии.

В 1911–1913 гг. д'Эрелль совершил два путешествия в Аргентину, в ходе которых создал и опробовал биологический метод борьбы с саранчой с помощью микроорганизма, выделенного им из этих насекомых. Именно в процессе работы над болезнями саранчи д'Эрелль впервые встречается с феноменом бактериофагии. В своих мемуарах он пишет, что кишечник инфицированных насекомых содержал почти чистую культуру патогенной бактерии (которую он называет коккобациллой). Чтобы получить отдельные колонии, исследователь использовал истощающий посев шпателем. В процессе этой работы он встретился с неожиданным явлением, которое в своих мемуарах [26] он описывает следующим образом: «...Но дважды в течение кампании возник неожиданный феномен, который привлек мое внимание. На первой чашке, той, на которой микробы были настолько многочисленны, чтобы образовать сплошной пастообразный слой, возникали чистые пятна, где культура, казалось, была удалена пробоотборником (à l'emporte-pièce). Среди них были малень-

кие пятна округлой формы и более крупные, неправильной формы, которые казались результатом слияния нескольких близко расположенных пятен. Как можно было объяснить это необычное явление, которое я раньше никогда не наблюдал на бактериальных культурах? Мое воображение заработало, и я в конечном итоге подумал, что, возможно, истинный патоген саранчи – это не коккобацилла, а другой микроб, очень маленький, невидимый вирус, ассоциированный с коккобациллой. ... Мы увидим, что именно этот феномен, на первый взгляд такой простой, положил начало исследованиям, которым предстояло посвятить тридцать лет работы и которые станут занятием для целых поколений бактериологов будущего».

Вернувшись в 1913 г. в Париж, д'Эрелль продолжил работать в Институте Пастера. В 1915 г. он исследовал вспышку дизентерии в драгунском эскадроне, расквартированном на отдых в городке Мезон-Лафит (Maisons-Laffitte) под Парижем. Будучи увлечен гипотезой, что диарея вызывается совместным действием неизвестного вируса и бактерии, д'Эрелль ставил эксперименты, аналогичные тем, которые он проводил во время работы по борьбе с саранчей. Он добавлял фильтрат фекалий пациентов к культуре дизентерийного микроба. В результате этих опытов часть культур, к которым добавляли фильтрат фекалий от *выздоравливавших* пациентов, лизировалась, а при посеве фильтратов, смешанных со свежей культурой дизентерийной палочки, на чашки с питательным агаром образовывались уже знакомые исследователю чистые округлые пятна (*tâches vièrges)*. Как д'Эрелль вспоминал впоследствии, он практически сразу понял, что имеет дело с вирусом, поражающим бактерии, который он (после обсуждения со своей женой и детьми) решил назвать бактериофагом (от греч. *фагос* – пожирающий). Сохранилась даже дата семейного совещания, на котором новый феномен получил название, существующее до наших дней – 18 октября 1915 г. [26].

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДЫ БАКТЕРИОФАГА В 1920–1930 ГОДЫ

Первая статья с описанием бактериофага вышла в Докладах Парижской академии наук в 1917 г. по представлению доктора Ру (Roux) [28]. В ней д'Эрелль показал способность бактериофага к неограниченному размножению, исследовал его специфичность по отношению к хозяевам и, самое важное, дал интерпретацию фаговых бляшек на газоне бактериальной культуры как единичных колоний бактериофага, а также использовал подсчет бляшек для количественного измерения концентрации бактериофага. Несмотря на многочисленные трудности работы в военное время, к 1921 г. д'Эрелль опубликовал книгу о бактериофагах под громким названием «Бактериофаг и его роль в иммунитете» (Bactériophage et son role dans l'immunité)[29]. В 1926 г. эта книга вышла на русском языке [30]. За короткий период с момента открытия бактериофагов д'Эрелль весьма далеко продвинулся в изучении нового явления. Формирование негативных колоний и зависимость их числа от разведения фага были, по мнению д'Эрелля, четким доказательством корпускулярной природы бактериофага, т.е. того факта, что фаг не имеет действующей концентрации, ибо достаточно единственной частицы вируса, чтобы вызвать лавинообразное размножение (что неизбежно влекло за собой мысль об аналогичной организации и вирусов высших организмов). Более того, проследив динамику роста числа инфекционных центров в инфицированной культуре, д'Эрелль обнаружил, что фаг размножается не непрерывно, а «толчками» [29]. Этот эксперимент, в сущности, соответствует широко известному эксперименту единичного цикла роста, который был вторично предложен Эмори Эллисом два десятилетия спустя.

Д'Эрелль также сообщает о физиологических изменениях (культуральные, ферментативные и антигенные свойства) у бактерий, получивших устойчивость к фагу (видимо, фагоустойчивых мутантов).

Помимо этого, д'Эрелль проделал огромную работу по изучению распространенности явления бактериофагии в природе. Он получил культуры фага к различным бактериям, в основном к возбудителям различных заболеваний из образцов воды, фекалий животных различных видов и иных источников, заложив, таким образом, основы экологической вирусологии.

Само название первой книги д'Эрелля говорит о том, что, по его мнению, фаг был частью защитных механизмов макроорганизма, определявшей выздоровление от дизентерии и, возможно, от иных инфекционных заболеваний. В своих мемуарах, озаглавленных, кстати, как «Странствия одного бактериолога» («Pérégrinations d'un bactériologiste»), д'Эрелль утверждает, что в ходе многочисленных путешествий в 1914–1927 гг. он собрал большой массив доказательств того, что выздоровление от самых различных инфекционных заболеваний людей и животных сопровождается появлением соответствующего бактериофага в их кишечнике, отсутствие же фага являлось, по его мнению, предик-

тором фатального исхода [26]. И именно фаг был, по мнению д'Эрелля, ключевым элементом «настоящего» иммунитета [31].

Идеи д'Эрелля о роли бактериофага в иммунитете вызвали жесткое противостояние с известным бельгийским иммунологом и бактериологом Жюлем Бордэ (Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet; 1870–1961), лауреатом Нобелевской премии 1919 г. за открытие системы комплемента [32].). В своей второй монографии, изданной в 1926 г. [33], д'Эрелль назвал работу Бордэ «историей ошибок». По его мнению, теория иммунитета Эрлиха, Мечникова и Бордэ – «это "теория иммунитета лабораторных животных"; она не имеет никакого отношения к реальному положению вещей и, в то же время представляет собой препятствие на пути познания истинных причин выздоровления, и является общественно опасной, поскольку она ведет к принятию профилактических мер, которые бесполезны или вредны» (цит. по Dublanchet [26]).

Вероятно, причиной столь критического отношения к иммунологии и иммунопрофилактике мог быть также опыт работы д'Эрелля в лаборатории по изготовлению вакцин Института Пастера в Париже в годы Первой мировой войны, где в крайней спешке приготовлялись многочисленные убитые вакцины, которые практически не тестировали [26] и, вероятно, в большинстве случаев были действительно неэффективны.

Бордэ, оскорбленный нападками д'Эрелля, присоединился к исследованиям бактериофагов, стараясь доказать несостоятельность взглядов своего оппонента. Он стал также противником самой идеи о том, что фаги представляют собой вирусы, и отстаивал мысль, что фаг – это не более, чем проявление собственной автолитической активности бактерий [1, 34]. В 1921 г. к группе Бордэ присоединился бельгийский микробиолог Андрэ Грациа [André Gratia (1893–1950)], который годом раньше случайно обнаружил (см. ниже) работу Туорта, ранее не привлекшую большого внимания, и в серии экспериментов продемонстрировал, что феномен Туорта и бактериофаг д'Эрелля – это однородные явления. В начале 1920-х гг. Грациа разделял взгляды Бордэ на природу бактериофага, и неудивительно, что полученные им результаты были использованы Бордэ, чтобы не только атаковать концепцию вирусов бактерий, отстаиваемую д'Эреллем, но и поставить под сомнение его приоритет в открытии этого феномена.

Для доказательства своих взглядов Жюль Бордэ и его коллеги развернули масштабную исследовательскую программу и достигли очень существенных фундаментальных результатов [34]. Они впервые описали явление лизогении [35, 36], впервые получили и применили нейтрализующую вирус антисыворотку (McKinley в лаборатории Bordet, [37]), исследовали специфичность ряда фагов к хозяевам и условия, необходимые для успешного роста фага. Тем не менее практически вплоть до окончательного разрешения вопроса в 1940-х гг. с помощью электронной микроскопии, Бордэ считал, что бактериофаг не является вирусом. «Способность образовывать фаги – писал Бордэ – встроена в наследственный аппарат бактерий». С современных позиций это звучит, как определение понятия «лизогения», однако следует учитывать, что для Бордэ и для большинства бактериологов того времени понятие «наследственность» воспринималось иначе, чем сейчас. Бордэ считал образование фага некоторым нормальным физиологическим процессом, возникающим как одно из состояний регуляции обмена веществ клетки. Категории вроде «генетической программы» были вне парадигмы его научного мышления.

С концепцией Бордэ был согласен известный американский биохимик Джон Нортроп (John Howard Northrop (1891–1987), Нобелевский лауреат 1946 г.). Нортроп основывал свою интерпретацию на сходстве кинетики роста концентрации бактериофагов в инфицированной культуре и кинетики накопления ферментов в процессе роста бактерий [38]. Он видел в образовании бактериофага аналогию с автокаталитической активацией ферментов [39], аналогичные аналогии использовал и Бордэ.

Под влиянием авторитета этих двух маститых ученых концепция «размножающегося автолитического фермента», хотя она и требовала больших натяжек для объяснения известных фактов, сделалась преобладающей в 1930-е гг. Так, в заключение своей Крунинской лекции «Теории бактериофага», прочитанной в Лондоне в 1930 г. по приглашению британского Королевского общества [40], Бордэ заявил: «С учетом всех экспериментальных документов не будет ли более рациональным думать, что этот вирус не существует, и что сильное действие бактериофага представляет собой не более чем патологическое преувеличение нормальной функции "клеток", связанной с мутациями, и что этот лизис на самом деле, как я чувствую себя в праве утверждать после десяти лет, прошедших с момента моего первого, совместного с Чиука исследования, <есть> трансмиссивный автолиз».

Тем не менее, ряд ученых продолжали придерживаться вирусной теории д'Эрелля. Интересно, что, помимо д'Эрелля, активным оппонентом Бордэ был другой бельгийский ученый

Ришар Брюиног (Richard Bruynoghe, 1881–1957). Профессор Брюиног был директором Института бактериологии в Лёвене, расположенном в окрестностях Брюсселя, где Бордэ возглавлял основанный им Брюссельский Институт Пастера. Оба эти исследователя были членами Бельгийского биологического общества, на заседаниях которого они и их ученики регулярно делали доклады, полемизируя по вопросу природы бактериофага. К сожалению, работы Брюинога не были опубликованы в более авторитетных, чем доклады этого общества, изданиях.

Поразительно, что обе группы практически полностью подтверждали экспериментальные результаты друг друга (см. обзор [34]), но расходились в их интерпретации. Так, обе группы наблюдали образование вариантов бактерий, устойчивых к фагам, и феномен адаптации фага к тем или иным штаммам хозяев, продемонстрировали специфичность фаг-нейтрализующих сывороток по отношению к расам фага, против которых они были получены, и сохранение этой специфичности в отношении фага, адаптированного к росту на другом штамме-хозяине.

Несмотря на то что многие данные свидетельствовали о том, что фаг имеет сложно организованную структуру, и что против одного и того же вида бактерий можно получить структурно различающиеся бактериофаги, группа Бордэ настаивала на своей теории. Любопытно, что сам д'Эрелль как минимум до 1930-х гг. продолжал придерживаться мнения, что бактериофаг – это единая сущность, обитающая в кишечнике людей и животных, которая лишь приспосабливается к разным видам бактерий, и именно эта адаптация фага лежала, по его мнению, в основе иммунного ответа, ведущего к выздоровлению [31].

Борде также активно протестовал против идеи корпускулярной природы фага, считая, что формирование бляшек, обнаруженое д'Эреллем может быть объяснено разведением чувствительных бактерий. По его теории, бактериолитический «принцип» представлял собой коллоид или даже растворимое соединение, эффективно адсорбирующееся на обломки лизированных клеток, из-за чего бактериофаг не проходил через ультратонкие фильтры. Отдельные, наиболее восприимчивые клетки культуры, запускали под его воздействием процесс автолиза, который оказывался сопряжен с синтезом новых порций «принципа» и приводил к образованию бляшек [40].

Оппонируя Бордэ, стажер Брюинога Рене Аппельман применил в 1921 г. метод предельных разведений, известный в наше время как титрование фага по Аппельману [41], и показал, что при максимальном значении разведения лизис наблюдается лишь в части параллельных пробирок, что совместимо только с идеей существования фага в виде отдельных частиц. Однако этот аргумент также не убедил Бордэ. В итоге этих многолетних дебатов профессор Брюиног, по-видимому, решил, что для него вопрос является абсолютно ясным, а упорство его оппонента основано на иррациональных мотивах. С 1927 г. Брюиног прекратил работы по бактериофагам [34].

Несмотря на ложные теоретические посылки Бордэ, его интерес к бактериофагам существенно ускорил прогресс их исследований и привлек в эту сферу ряд талантливых молодых бельгийских ученых.

Андре Грациа, молодой бельгийский микробиолог, начал свою карьеру в лаборатории физиологии Свободного университета Брюсселя, где Бордэ занимал в то время пост профессора бактериологии.

В 1920 г. Грациа отправился для работы в Рокфеллеровский институт в Нью-Йорке, где его коллега Петер Олицкий порекомендовал Грациа статью о менингококках, вышедшую в 1915 г. Поскольку Олицкий не мог вспомнить точной ссылки, Грациа вынужден был пролистать весь том журнала за 1915 г. и наткнулся на статью Туорта [42]. Он приступил к собственным исследованиям, и вскоре пришел к выводу, что феномен Туорта идентичен бактериофагу, описанному д'Эреллем [35, 43]. Таким образом, Андре Грациа оказался первым исследователем бактериофагов в США. По-видимому, он был одним из прототипов сложного характера Мартина Эроусмита – главного героя романа Синклера Льюиса «Эроусмит» (Пулитцеровская премия 1926 г.), молодого микробиолога, работающего в 1920-е гг. в Америке над исследованием бактериофагов и проблемами фаговой терапии [42] (предположительно, в числе прототипов этого героя был также и Ф. д'Эрелль; [44]). Эта тематика настолько увлекла Грациа, что он продолжал заниматься бактериофагами в течение всей своей оставшейся научной карьеры. После работы в Нью-Йорке Грациа вернулся в Европу, в лабораторию Бордэ, где продолжил исследования бактериофагов. В начале 1920-х гг. он в целом разделял теоретические концепции Бордэ, но впоследствии постепенно убедился в правоте воззрений д'Эрелля [42].

Работы Андре Грациа предвосхитили целый ряд важных открытий в биологии бактериофагов (подробнее см. обзор [42]). Так, во время своей работы в Рокфеллеровском институте Грациа обнаружил диссоциацию (фазовую вариа-

цию?) культуры *Escherichia coli* (в то время *Bacillus coli*) на два фенотипически различающихся варианта S и R (от слов sensitive and resistant, не путать с диссоциацией smooth – rough). Культуры отличались по степени восприимчивости к бактериофагу, который использовал исследователь. При этом Грациа путем селекции удалось также получить фаг, более эффективный против штамма R, который имел также отличия по морфологии бляшек и по спектру хозяев [35, 43]. Таким образом, Грациа обнаружил образование наследуемых вариаций (мутаций или фазовых вариантов?) фагочувствительности бактерий, возникающих до контакта с вирусом. Кроме того, он впервые описал наследуемые изменения (мутации по спектру хозяев) у самого бактериофага. Однако сам Андрэ Грациа пришел к подобным интерпретациям существенно позже [42, 45]. В 1921 г. он придерживался взглядов Бордэ. Вместо термина «бактериофаг» он использует термин «литический принцип», принятый школой Бордэ. Более того, описанная выше альтернативная концепция, объясняющая возникновение бляшек, была сформулирована и обоснована именно в его работе [35]. Для ее доказательства Грация поставил логичный эксперимент, показавший, что число бляшек, образующихся при посеве одинаковой дозы колифага, зависит от разведения культуры, используемой для образования бактериального газона. Этот странный результат, впоследствии опровергнутый в работе Элиса и Дельбрюка (см. ниже), вероятно, объяснялся физиологическим состоянием исходной чрезмерно сконцентрированной суспензии и слишком широким диапазоном ее разведения.

Любопытно, что результаты Грациа были совершенно иначе интерпретированы американским генетиком Германом Мёллером (Hermann Joseph Muller (1890–1967)), который в 1922 г. писал: «...Грациа обнаружил, что эта субстанция “бактериофаг” посредством соответствующей обработки на других бактериях может изменяться ..., сохраняя свою способность к самовоспроизведению.

Эти две субстанции – субстанция д’Эрелля и гены – обе должны обладать этим наиболее замечательным свойством наследуемой вариабельности или «мутабильности ... если тельца д’Эрелля и в самом деле гены, фундаментально такие же, как и наши хромосомные гены, это дало бы нам совершенно новое направление, чтобы атаковать проблему гена... Было бы слишком поспешно назвать эти тельца генами, но мы должны признать, что в настоящее время мы не знаем ни одного свойства, которое различало бы гены и их. Таким образом, мы не можем категорически отрицать, что мы, возможно, сможем растирать гены в ступке или запекать их в печи» [46].

Это высказывание Мёллера является, по-видимому, первой формулировкой близкой к современной концепции вируса, как трансмиссивной генетической программы, приводящей к собственному воспроизведению. Идеи Мёллера могли повлиять на Макса Дельбрюка (см. ниже), с которым Мёллер познакомился во время своей работы в Берлине в лаборатории Тимофеева-Ресовского [47].

К сожалению, большинство других работ Андре Грациа не были замечены современниками. Его имя запомнилось главным образом в связи с усовершенствованием метода посева фага на плотных средах, заключавшегося в использовании тонкого слоя мягкого агара поверх обычного агара в чашках – так называемое титрование фага по Грациа.

Не сразу были замечены и данные венгерского биохимика Макса Шлезингера (Max Schlesinger; 1904–1937), который впервые получил очищенный препарат бактериофага путем фильтрования через фильтры с различным размером пор и осаждения на ультрацентрифуге и доказал, что бактериофаг состоит из белка и ДНК (различить ДНК и РНК он смог с помощью реакции Фельгена), что совпадало с составом хромосом, выделяемых из высших организмов [48]. Интересно, что М. Шлезингер также одним из первых провел в 1932 г. точные количественные исследования кинетики адсорбции бактериофага *E. coli,* продемонстрировав, что эта реакция в первом приближении соответствует кинетике второго порядка (Schlesinger 1932, цит. по сборнику Stent [1]), а также оценил размерный класс частиц бактериофагов (~0,1 мкм).

Однако полученные в 1930-е гг. оценки размеров фаговых частиц с помощью ультрафильтрации и с помощью осаждения на скоростных центрифугах [49], также не могли быть напрямую интерпретированы, а первые фотографии фаговых частиц, полученные в 1939 г. Гельмутом и Эрнстом Руска (Helmut Ruska 1908–1973, Ernst Ruska 1906–1988) [50], см. также обзор Kruger et al. [51], были опубликованы в нацистской Германии, и вследствие этого оказались не доступны мировому научному сообществу.

Таким образом, несмотря на установление ряда ключевых свойств вирусов бактерий и появление верных теоретических концепций, к концу 1930 гг. консенсус по вопросу о физической природе бактериофага не был достигнут. Само существование различных видов бактериофагов подвергалось сомнению д’Эреллем, кото-

рый считал, что различные расы фага были фенотипическими вариантами, возникающими в результате адаптации универсального *Bacteriophagum intestinale* [31].

Весьма примечательно, что в ходе описанной выше научной дискуссии все ключевые участники пытались описать природу бактериофага по аналогии с ранее успешно исследованными ими системами. Так, очевидно, Бордэ и Нортроп видели за явлением бактериофагии механизм, похожий на изученные ими ранее ферментативные системы (активации комплемента, а также тромбина и протеолитической активации трипсина соответственно). Хотя взгляды д'Эрелля были несколько ближе к истине, он также оказался в плену своей теории ультрамикроскопического микроба, клетки «в гистологическом смысле слова» [26], и не воспринимал серьезно гипотезу трансмиссивного гена.

Любопытно также, что несмотря на неопределенность по вопросу о природе бактериофагов, их фундаментальное свойство проявлять высокую степень специфичности к определенным видам и штаммам бактерий хозяев было не только в должной мере доказано, но и стало активно применяться для быстрого и высокоразрешающего типирования изолятов бактерий в исследовательской и эпидемиологической практике. Вопреки распространенному убеждению, технология фаготипирования была впервые создана не в Канаде (1936 г.) и не в Англии (1940 г.), а в Веймарской республике в 1920-е гг. [52], при этом немецкие микробиологи параллельно работали как над фундаментальной проблемой фага, так и над совершенствованием его практического применения.

ОТКРЫТИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ КОНЦЕПЦИИ ЛИЗОГЕНИИ

История открытия феномена лизогении и ранних исследований, приведших к расшифровке сути данного явления, чрезвычайно подробно описана одним из наиболее известных участников этих событий Андре Львовым (André Michel Lwoff (1902–1994)) [53], здесь же мы упомянем лишь основные вехи этого пути. В соответствии с реконструкцией Львова, открытие феномена лизогении прошло через четыре основные стадии.

1) Явление тесной ассоциации бактерий и бактериофагов в перевиваемой культуре впервые описано Бордэ и Чиука в 1920–1921 гг. [36] (д'Эрелль также наблюдал аналогичное явление [29], но не придал ему существенного значения, считая, что имеет дело со смешанной культурой бактерий и фагов, в современной терминологии carrier state). Одновременно о получении выделяющей фаг культуры сообщили Otto и Munter [54, 55].

2) В 1922 г. Bail [56] предлагает теорию осколков (splitter theory), в соответствии с которой фаги представляют собой обломки разрушающихся бактерий, способные индуцировать разрушение новых клеток. Эту теорию критиковал д'Эрелль [53].

3) В 1924 г. Gildmeister и Herzberg [57] приводят доказательства того, что лизогенный штамм *E. coli* 88 сохраняет способность выделять фаг в отсутствии контакта с внеклеточным фагом. Их выводы в 1925 г. подтверждает Bail [58], который провел данную культуру через 6 последовательных выделений отдельной колонии, но она тем не менее сохранила способность к продукции фага. К выводу о том, что все клоны данной культуры сохраняют способность выделять фаг, пришел также Bordet [59]. Эти заключения были очень существенным достижением в начале 1920-х гг., поскольку примерно в это же время происходила смена парадигмы в микробиологии. Если раньше в качестве единичного организма воспринималась культура микроба, то в этот период в центре мышления исследователей постепенно оказывалась микробная клетка [12].
4) Работавший в лаборатории Бордэ Е. МакКинли получил сыворотку против бактериофага из *E. coli* 88 и показал, что обработка культуры этим фагом не уничтожает способности ее субклонов к продукции бактериофага [37].

Таким образом, к 1925 г. Бэйл и Бордэ параллельно пришли к утверждению, что существуют бактериальные культуры, все субклоны которых в течение неограниченного числа поколений сохраняют способность продуцировать фаг. Они также показали возможность получить лизогенные культуры из нелизогенных, обрабатывая их соответствующим бактериофагом. Бордэ четко разграничил понятия «сильного» и «слабого» литических принципов (principes forts et faibles), которые примерно соответствуют современным понятиям «вирулентный» и «умеренный» фаг. С этого момента явление лизогении можно считать открытым и четко дифференцированным от состояния носительства, однако для расшифровки его биологической сущности потребовалось еще более четверти века усилий.

Данной проблемой занимались многочисленные исследователи (в том числе Ф.М. Бёрнет (F.M. Burnet), М. МакКи (M. McKie), О. Бэйл (O. Bail), Дж. Х. Нортроп (J. H. Northrop) и другие [53]. Bordet и Renaux [60] в своей работе 1928 г. утверждали, что способность к продукции бактериофага «вставлена» в наследственный аппа-

рат бактерии. Однако несмотря на удивительную точность этого выражения с позиций современного знания [53], школа Бордэ была крайне далека от верного понимания природы бактериофага в целом и лизогении в частности. Для Бордэ наследственность бактерий представлялась синонимом гомеостаза клеток, идеи об отдельном материальном носителе наследственности были в это время ему чужды.

Основной загадкой лизогенных культур было то, что свободный фаг присутствовал в них в количестве на несколько порядков меньшем, чем бактериальные клетки, тем не менее каждая такая клетка могла дать начало лизогенному клону. Вопрос о том, в какой форме фаг присутствует в лизогенных клетках, оставался неразрешенным. Австралийские исследователи Burnet и McKie [61] в 1929 г. установили, что при искусственном разрушении лизогенных клеток с помощью другого бактериофага в них не обнаруживается инфекционных частиц умеренного фага. Более того, было выяснено, что при лизогенизации нелизогенных клеток бактериофагом полученные лизогены продуцируют именно тот фаг, который был использован для лизогенизации. Основываясь на этих данных, Бёрнет (Sir Frank Macfarlane Burnet (1899–1985), Нобелевский лауреат 1960 г.) сформулировал теорию зародыша фага (anlage), который присутствует во всех клетках культуры, но лишь в некоторых может быть активирован (подробнее об исследованиях бактериофагов М. Бёрнетом см. обзор [62]). Однако австралийская школа склонялась к тому, что зародыш представляет собой фактически бактериофаг, активность которого блокирована каким-то механизмом или лигандом [63].

В 1931 г. датский микробиолог Dooren de Jong, E. D. [64] сообщил о получении из лизогенного штамма *Bacillus megaterium* 899 нелизогенного и неспорообразующего мутанта, чувствительного к фагу, выделяемому исходным штаммом. Исследователь установил, что споры лизогена, прогретые при 100 °C, дают начало лизогенным клеткам, хотя сам фаг инактивировался в этих условиях. Автор пришел к заключению, что фаг не содержится как таковой в лизогенных бактериях, но может продуцироваться ими (надо отметить, что это в целом верное заключение было недостаточно обосновано, так как структуры вегетативной клетки бацилл также разрушаются нагреванием, но они становятся термоустойчивыми внутри спор).

Гораздо ближе к истинному объяснению лизогении подошли французский ученый русского происхождения Евгений Вольман (Eugène Wollman; 1883–1943) и его жена Элизабет Вольман, работавшие в Институте Пастера в Париже. Еще в 1925 г. Е. Вольман впервые высказал предположение, что бактерии могут иметь гены, и что эти гены могут в некоторых случаях передаваться через внешнюю среду [53], а в 1928 г. он высказал предположение, что и лизогенизация бактерий происходит в результате передачи им соответствующих генов [65].

С 1934 г., действуя в рамках своей концепции, Вольманы приступили к работе с культурой *Bacillus megaterium* 899. Они подтвердили, что способность продуцировать фаг присуща потомству любой клетки данной культуры, но при разрушении клеток лизоцимом активного бактериофага из них не выделяется [66, 67]. Они также сформулировали концепцию двух фаз цикла соответствующего бактериофага – литической, проявляющейся в продуктивной инфекции клеток, и скрытой, в которой фаг находится в составе лизогенных бактерий. Эти же ученые предложили термин «умеренный фаг» для обозначения бактериофага, способного к лизогении [68]. На основании косвенных данных они предполагали, что выделение фага лизогеном сопряжено с лизисом клетки. Вольманы продолжали работать над этой темой в оккупированном (после 1940 г.) немецкими войсками Париже, но публикация новых результатов была невозможна. Для окончательного разрешения вопроса о способе продукции фага они стали использовать микроманипулятор, впервые переведя работу с фагами на уровень изучения отдельных клеток [53]. Но эта работа не была ими завершена – в 1943 г. Эжен и Элизабет Вольман, имевшие еврейское происхождение, были арестованы нацистами в Институте Пастера и отправлены в лагерь смерти Аушвиц, где и погибли.

В 1950-е гг. исследования лизогении на этом же объекте были продолжены Андре Львовым (см. выше), который в предвоенные годы близко дружил с Вольманами, был знаком с их идеями, но в тот момент не проявил к их работе особого интереса. Вместе с Антуанет Гутман Львов использовал непосредственное наблюдение за микроколониями клеток в маленьких каплях среды с помощью светового микроскопа. Периодически исследователи производили высев материала из капель для обнаружения фаговых бляшек на газоне чувствительной бактериальной культуры. В результате им удалось показать, что лишь при внезапном лизисе одной из клеток в капле появлялось ~100 частиц свободного бактериофага, тогда как в каплях, где все клетки продолжали делиться, фаговые частицы полностью отсутствовали, иногда и в нескольких пассажах [69]. Это однозначно свидетельствовало, что передача способности к продукции фага

при пассажах лизогенной культуры фага не происходит путем реинфекции чувствительных клеток, как предполагал М. Дельбрюк, но является результатом тесной ассоциации фага с генетическим аппаратом клетки. Более того, генетическая программа, реализуемая в клетках, которые продуцируют фаг, отличается от программы большинства других клеток лизогенной культуры. Львов и Гутман предложили термин «профаг» для обозначения гипотетической неинфекционной формы бактериофага в лизогенной клетке.

В 1950 г. Lwoff et al. [70] публикуют первую работу, где они описывают стимуляцию продукции фага лизогенной культурой при ультрафиолетовом облучении – индукцию фага. В результате этих и ряда иных работ Львов сформулировал описание лизогенного цикла бактериофага, близкое к современному. За эти работы в 1965 г. Андре Львов был удостоен Нобелевской премии.

Окончательное же установление природы профага стало возможным преимущественно в результате работ по исследованию бактериофага λ, обнаруженного Э. Ледерберг в лаборатории Дж. Ледерберга. История исследований бактериофага λ подробно описана современниками этих событий (см. обзоры Hershey and Duve, [71], A. Campbell в книге Херши [72], см. также обзоры [73–75]). Эти события были связаны с первыми шагами молекулярной генетики бактерий. В 1946 г. Lederberg и Tatum (Joshua Lederberg (1925–2008), Нобелевский лауреат 1958 г.) [76] открыли рекомбинацию (в современных терминах – конъюгацию) у штамма *E. coli* K-12, выделенного еще в 1922 г. из клинического образца в Калифорнии. Это дало возможность впервые применить методологию генетического анализа для исследования бактерий. После 1953 г., когда была открыта первая конъюгативная плазмида – F-фактор – и получены Hfr-штаммы (high frequency of recombination), в которых с высокой частотой происходил конъюгационный перенос хромосомы (за счет интеграции F-фактора), эффективность генетического анализа резко возросла (см. ссылки в работе [74]). Однако данная методология требовала наличия большого числа фенотипически различимых мутантов, на скрещивании которых строилась работа по картированию хромосомы бактерий и другие исследования. Получение таких мутантов именно того штамма *E. coli* K-12, на котором была показана возможность производить скрещивания, было весьма актуальным. Э. Ледерберг облучала культуру этого штамма ультрафиолетом с целью последующего отбора ауксотрофных мутантов. Однако оказалось, что один из полученных ей штаммов при контакте с родительским штаммом лизировался. Оказалось, что исходный штамм был лизогенным, и Э. Ледерберг удалось случайно получить излеченную от профага культуру, ставшую чувствительной к данному фагу [77]. Получение экспериментальной системы, позволявшей исследовать лизогению с помощью методологии генетического анализа, обеспечило быстрый прогресс исследований, которые мы опишем здесь лишь кратко (подробнее см. обзоры [74, 78]). В результате этой работы было установлено, что профаг λ не является цитоплазматическим фактором, но тесно сцеплен с собственным хромосомным маркером ферментации галактозы *gal* [79]. Позднее было показано, что профаг не просто прикреплен к хромосоме бактерии в районе гена *gal*, но встроен между генами *gal* и *bio* (синтез биотина), и в лизогенных клетках генетическое расстояние между этими маркерами увеличено. Наконец, в 1957 г. Ф. Жакоб и Э. Вольман (сын Евгения и Элизабет Вольманов, упомянутых выше) обнаружили, что при конъюгационном переносе профага из лизогенного донора в нелизогенную клетку-реципиент с высокой частотой происходит индукция и гибель реципиента с высвобождением фагового потомства [80]. Этот эффект исходно был назван «эротической индукцией», но затем из соображений приличия переименован в зиготную индукцию [74]. Зиготная индукция однозначно свидетельствовала о наличии в лизогенных клетках цитоплазматического фактора, репрессора, который поддерживает профаг в молчащем состоянии. Но так как при конъюгации транспортируется лишь ДНК, в клетке реципиента профаг оказывается дерепрессирован. Спустя 10 лет Ptashne [81] смог изолировать этот белок из лизогенных клеток, используя его специфическое связывание с ДНК фага λ. Исследования регуляции жизненного цикла фага λ [82] наряду с изучением лактозного оперона легли в основу первых представлений о контроле экспрессии генов.

Интересно, что классическая схема интеграции – эксцизии фага λ с использованием кольцевого интермедиата была предложена Campbell лишь в 1962 году. Позже он описал историю этого события [78]. Эта схема была последним существенным элементом, после которого концепцию лизогении, близкую к современным представлениям, можно считать сформированной.

ОТКРЫТИЕ ФАГОВОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Практически одновременно с обнаружением фага λ в лаборатории Дж. Ледерберга в 1951 г. Н. Циндером (Norton Zinder, 1928–2012) было от-

крыто явление трансдукции. История этого открытия описана Zinder в обзоре [83]. Работа Циндера была связана с попытками картирования хромосомы *Salmonella typhimurium* с помощью конъюгации. Он получил 22 штамма *S. typhimurium* из шведской лаборатории К. Лиллеенгена и отобрал по несколько двойных ауксотрофных мутантов для каждого из этих штаммов. После контакта различных пар мутантов производили отбор потенциальных рекомбинантов (транс-конъюгантов) по возврату к прототрофности по маркерам одного из штаммов (реципиента). В попытках найти подходящие конъюгационные пары Циндер обнаружил, что скрещивания удаются только между мутантами штаммов LT-2 и LT-22. Однако в отличие от экспериментов на *E. coli* K-12, в которых происходила одновременно передача значительного числа хромосомных маркеров, в скрещиваниях Циндера переносился каждый раз лишь один маркер, причем донором оказывался всегда штамм LT-22. При первых же экспериментах перенос маркера можно было наблюдать лишь для одной из исследованных пар штаммов. Для выяснения необходим ли для данного переноса прямой контакт клеток Циндер и Ледерберг использовали установку, которая была ранее создана в их лаборатории для исследования необходимости прямого контакта клеток при конъюгации у *E. coli*. Прибор представлял собой U-образную стеклянную трубку, разделенную посередине фарфоровой мембраной с диаметром пор меньшим, чем размер бактериальных клеток. Суспензии клеток штаммов донора и реципиента помещали с разных сторон мембраны. После некоторого времени инкубации культуральную среду продавливали сжатым воздухом из одной половины трубки в другую и обратно, при этом клетки бактерий оставались в своих отсеках. В отличие от конъюгации у *E. coli*, в исследуемой Циндером системе для передачи маркера было достаточно контакта с культуральной жидкостью культуры донора. Поиск агента, переносящего мутацию, привел к обнаружению в супернатанте донора бактериофага, способного образовывать бляшки на штамме реципиенте. Это оказался умеренный фаг P22. Особенности механизма упаковки ДНК фага P22 приводят к частой ошибочной упаковке в некоторые вирионы случайных фрагментов генома хозяина с образованием трансдуцирующих частиц. Поэтому при каждом акте трансдукции переносится лишь небольшой фрагмент хромосомы, содержащий не более одного маркера. Такое явление получило название общей трансдукции. В дальнейшем при попытке исследовать возможность трансдукции фагом λ, Morse et al. [84] обнаружили, что перенести удается только ген *gal*, рядом с которым происходит интеграция профага. Это явление, получившее название специфической трансдукции, связано с тем, что с небольшой вероятностью вырезание генома профага происходит неправильно. Дальнейшее исследование специфической трансдукции привело к существенному прогрессу в понимании механизмов сайт-специфической рекомбинации при интеграции и эксцизии фага λ [73, 74, 78].

ВЗЛЕТ И ПАДЕНИЕ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ В 1920–1940 ГОДЫ

Совершенно логично, что д'Эрелль, считавший фаги частью естественного иммунитета [26, 29, 85] попытался усилить гипотетическое естественное лечебное действие фага путем введения больному его препаратов, полученных *in vitro*. Эта технология приобрела с его легкой руки большую популярность в 1920–1930 гг., однако по различным причинам была практически оставлена западной медициной к концу 1940-х гг., хотя продолжала использоваться в СССР и некоторых других странах. В настоящее время фаговая терапия (ФТ) вновь рассматривается, как одно из возможных решений кризиса, связанного с распространением резистентности к антибиотикам. Благодаря этому, первый период фаговой терапии уже стал предметом большого числа исторических работ и обзоров [86–91] и продолжает активно исследоваться в настоящее время. Здесь мы приведем лишь основные вехи сложной и противоречивой истории ФТ.

В 1919 г., практически сразу же после открытия бактериофага, д'Эрелль провел обширное и даже по современным меркам хорошо контролируемое полевое исследование профилактической и лечебной эффективности бактериофагов против куриной холеры (инфекции, вызванной *Salmonella gallinarum*), которая приводила к большим экономическим потерям французских птицеводов. Он провел исследования по использованию бактериофага для борьбы с куриной холерой. В том же году под руководством проф. Виктора Анри Гутинеля (Victor Henri Hutinel (1849–1933)), директора детской больницы Hôpital des Enfants-Malades в Париже, бактериофаг был применен для лечения дизентерии у ребенка, закончившейся после этого быстрым выздоровлением. Перед этим д'Эрелль, члены его семьи, сотрудники, а также некоторые врачи принимали фаг в значительно больших количествах и убедились в отсутствии побочных эффектов. Д'Эрелль также вводил себе подкожно 1 мл фагового лизата, что также не вызвало ни-

каких нежелательных эффектов, после чего инъекции были выполнены его жене и дочерям, и также без малейших негативных последствий [33, 87]. Это наблюдение особенно удивительно, поскольку лизат никак не был очищен от компонентов разрушенных клеток, в частности от липополисахарида, способного вызывать повышение температуры и даже токсический шок! Тем не менее по меркам начала прошлого столетия проведенная оценка безопасности препарата была совершенно достаточна, что позволило пойти на применение бактериофага у больного ребенка.

Разработанная д'Эрелем фаговая терапия стала вторым этиотропным средством антибактериальной терапии после сальварсана Пауля Эрлиха (Paul Ehrlich, 1854–1915), токсичного соединения мышьяка, которое тем не менее весьма успешно употреблялось с 1910 г. для лечения сифилиса [92]. В дальнейшем д'Эрелль совершает несколько путешествий и применяет фаговую терапию для лечения вызванной *Pasteurella multocida* геморрагической лихорадки крупного рогатого скота в Индокитае, бубонной чумы – у четырех заболевших на борту судна, проходившего через Суэцкий канал, а также для лечения и профилактики холеры в Индии в 1927–1931 гг. [26, 33, 87]. В последнем случае это было масштабное исследование, развернувшееся в провинции Асам. Были выбраны два городка, Наогаон и Габигандж, которые были сопоставимы по своим размерам и условиям жизни в них. В Наогаоне в 1928 г. сотрудники д'Эрелля раздавали сначала ограниченные, а затем, с 1929 г., и весьма значительные количества фагового препарата. Со второй половины 1929 и до 1935 г. в Наогаоне вспышки холеры не наблюдались, тогда как в контрольном Габигандже они продолжались с обычной периодичностью и интенсивностью. Однако с 1932 г. индийское правительство распорядилось раздавать препараты и населению Габиганджа. И хотя в оставшиеся 3 года исследования смертность от холеры в данном регионе практически сошла на нет (при продолжавшихся вспышках в соседних провинциях), отказ от контрольной группы значительно снизил научную ценность полученного результата [93–95]. История этого реального исследования поразительно совпала с драматической историей вымышленного эксперимента по профилактике и лечению чумы с помощью фагов, который осуществил герой романа С. Льюиса доктор Мартин Эроусмит, также вынужденный нарушить схему эксперимента под давлением обстоятельств. Как ни удивительно, роман «Эроусмит» вышел в 1925 г., за два года до начала холерной эпопеи Феликса д'Эрелля.

К началу 1930-х гг., благодаря энтузиазму д'Эрелля и его сотрудников, ФТ приобрела большую популярность во всем мире, причем несколько ведущих фармацевтических компаний во Франции, Англии и США начали продавать фаговые препараты [87]. Производство на одной из этих компаний, «Les laboratoires Robert and Carriere», в Париже было организовано самим д'Эреллем перед его отбытием в США в 1928 г., где он получил пост профессора Йельского университета [26]. Хотя д'Эрелль придавал большое значение правильному выбору и приготовлению лечебных бактериофагов [96, 97] и корректности их рекламы, его деловые партнеры нарушили соответствующие обязательства [26]. Аналогичные проблемы с поддержанием качества наблюдались и у других производителей, что в итоге было одним из факторов, приведших к дискредитации ФТ к концу 1930-х гг. В 1934 г. по заказу Американской медицинской ассоциации в ее журнале «*JAMA*» был опубликован подробный обзор литературы по фаговой терапии, написанный двумя Йельскими профессорами Монро Итоном (Monroe Eaton) и Стэнхопом Бейн-Джонсом (Stanhope Bayne-Jones) [98]. Авторы отмечали, что имеются как свидетельства высокой эффективности ФТ, так и сообщения о ее неэффективности. В последующих двух обзорах, заказанных этим журналом и вышедших в 1941 и 1945 гг. [99, 100], авторы также отмечали противоречивость результатов ФТ, при этом во всех трех работах обсуждалось несоответствие между мощным действием бактериофагов *in vitro* и их не всегда достаточной эффективностью *in vivo*.

Хотя по своим выводам данные обзоры могли бы скорее послужить основанием для дальнейших исследований, появившиеся на рынке сульфаниламидные препараты, а затем и первые антибиотики [92] вызывали гораздо больший энтузиазм медицинского сообщества. По-видимому, некоторую роль в подрыве доверия к ФТ сыграли также, активно пропагандируемые д'Эреллем, его «еретические» взгляды на фаги как ключевой компонент естественного иммунитета [26, 85], которые вступали в противоречие с массивом данных активно развивающейся иммунологии.

Одновременно с описанными событиями в Европе и США, ФТ развивалась в Советском Союзе. К сожалению, большая часть этих исследований не была отражена в публикациях в научных журналах, оставшись на страницах различных сборников, отчетов и монографий, труднодоступных современным исследователям. В значительной мере история ФТ в СССР до 1955 г. реконструирована в исследовании D. Myelnikov [89].

Первые сообщения о выделении бактериофагов в СССР датируются 1922 г., а с 1929 г. в Харькове М. Мельником и И. Ручко развернута исследовательская программа по лечебному и терапевтическому применению фагов против дизентерии [89]. В 1933 г. С. Казарновская опубликовала первую в СССР монографию по бактериофагии (не считая перевода первой книги д'Эрелля, вышедшего в 1926 г.) [101].

В 1930-е гг. в той или иной степени фаговые исследования были развернуты более, чем в десятке советских институтов от Минска и до Хабаровска. Одним из важнейших центров стал институт в Тбилиси. Его создание связано с деятельностью талантливого микробиолога Г. Элиавы (подробнее биографию Элиавы см. на сайте https://www.multispecies.org/copy-of-giorgi-and-felix-pt2). Этот ученый дважды стажировался в Институте Пастера в Париже, где он работал совместно с д'Эреллем, а в начале 1930-х гг. добился от советского правительства приглашения д'Эреллю приехать работать в СССР. В 1933–1935 гг. д'Эрелль действительно дважды посетил СССР [26, 89, 91]. Элиава смог также добиться решения о создании нового института, строительство которого началось в Тбилиси. Однако в 1937 г. Элиава был арестован по нелепому обвинению во вредительстве и впоследствии расстрелян. Такая же участь постигла и упомянутых выше харьковских исследователей М. Мельника и И. Ручко. Ф. д'Эрелль более не возвращался в СССР. Тем не менее новый институт в Тбилиси был достроен и начал работу в 1939 г. Ставшее одним из главных центров фаговой терапии в СССР, это учреждение существует и поныне в Грузии, носит название «Научно-исследовательский институт бактериофага, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиавы» и является одним из мировых центров практической фаговой терапии.

В годы Второй мировой войны работы по ФТ активно вели в основном в интересах военной медицины. Специальные бригады хирургов направляли во фронтовые госпитали для исследования эффективности фаговой терапии для профилактики и лечения раневых инфекций, уносивших жизни огромного количества солдат и офицеров. Ключевую роль в этих работах сыграли группы доктора М.П. Покровской из Ленинграда (исходно ее работа была начата на противочумной станции в Ставрополе) и проф. А.П. Цулукидзе из Тбилисского института [102, 103]. Эти исследования дали положительные результаты. Производство фаговых препаратов развертывали даже в непосредственной близости к линии фронта. Так, Зинаида Виссарионовна Ермольева (1898–1974), более известная как автор советской версии пенициллина (названного ей крустозином), организовала производство фагов в осажденном Сталинграде. Интересно, что Ермольева стала прототипом Татьяны Власенковой – главной героини романа В. Каверина «Открытая книга», завершенного в 1956 г. Сюжет этого произведения во многом перекликается с романом «Эроусмит» Синклера Льюиса, однако примечательно, что, в отличие от своего реального прототипа, героиня В. Каверина не участвовала в работе с бактериофагами. По-видимому, это было отражением научной моды того периода, когда интерес к ФТ резко упал даже у советских микробиологов. В частности, сама З. Ермольева с конца 1940-х гг. полностью переключилась на исследования антибиотиков [89].

Работы по ФТ были продолжены и в послевоенное время. По мнению британского историка Д. Мельникова (2018), легкое принятие и последующее сохранение ФТ в СССР было связано с тем, что идеология этой терапии, и даже своеобразные теории иммунитета Ф. д'Эрелля были созвучны экологической направленности русской микробиологической школы, в том числе и школы медицинской микробиологии. Возможно, определенную роль сыграл и плановый характер советской экономики, при котором исследовательские и производственные задачи перекочевывали из плана в план, и требовалось проявление чьей-то политической воли, чтобы отказаться от тех или иных направлений. Исследовательская работа в области ФТ в 1950–1990 гг. преимущественно сводилась к разработке новых лекарственных форм и клиническому тестированию бактериофагов. Так, в конце 1960-х гг. Солодовниковым с соавт. были проведены несколько масштабных и хорошо контролируемых экспериментов по изучению эффективности сухого дизентерийного бактериофага как средства профилактики в детских коллективах [104–106]. Однако, насколько известно автору, существенных попыток усовершенствования основ ФТ (например, изучения фармакокинетики, исследования возникновения резистентных мутантов и т.д.) в СССР не осуществлялось. Производство фаговых препаратов сохранилось до наших дней, и они присутствуют в аптеках в России и в Грузии. Интересно, что сохранение практической ФТ в СССР и в некоторых странах Восточной Европы (в Польше и Чехословакии) сыграло свою роль в окончательном отказе от ФТ на Западе. Эта технология стала восприниматься как медицина, связанная с коммунистическими или с тоталитарными режимами (так, например, фаговые препараты были обнаружены в трофейном медицинском оснащении войск Третьего Рейха

[87]). Определенное значение имели и иные социально-психологические факторы [107].

На Западе производство фаговых препаратов полностью прекратилось в 1970 гг. [87]. Однако с конца 1990 гг. наблюдается возрождение интереса к этой технологии в связи с критическим ростом полирезистентных бактериальных инфекций.

РАБОТА ФАГОВОЙ ГРУППЫ И РОЖДЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Зарождение молекулярной генетики бактериофагов тесно связано с деятельностью Макса Дельбрюка (Max Ludwig Henning Delbruck; 1906–1981) в Калтехе в 1938–1954-х гг., а также работами Фаговой группы – неформального объединения ученых, лидером которого был Дельбрюк [47]. В 1969 г. трем первым участникам Фаговой группы – М. Дельбрюку, Сальвадору Луриа (Salvador Edward Luria (1912–1991)) и Альфреду Херши (Alfred Day Hershey (1908–1997)) была присуждена Нобелевская премия. Крайне интересна формулировка комитета на церемонии вручения: «Честь в первую очередь принадлежит Дельбрюку, который превратил исследования бактериофагов из смутного эмпиризма в точную науку» (https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1969/ceremony-speech/). Т.е. Нобелевский комитет решил в первую очередь отметить лауреата не как автора какого-то определенного открытия или теории, но как человека, изменившего стиль работы, что привело к значительному прогрессу в данной области. Случай достаточно необычный в практике присуждения этой престижной награды. Важным источником информации о деятельности Фаговой группы может служить сборник статей-воспоминаний ключевых участников событий, изданный под редакцией Г. Стента в 1966 г. [108].

Макс Дельбрюк – немецкий физик-теоретик, работавший в начале 30-х гг. с Нильсом Бором в Копенгагене, а также сотрудничавший с русским генетиком Н. Тимофеевым-Ресовским и Г. Мёллером. В 1937 г., получив двухлетнюю стипендию Рокфеллеровского фонда, Дельбрюк отправляется в США, желая заниматься экспериментальной (!) генетикой. Последовавшие вскоре политические события в Германии и начало Второй мировой войны помешали ему вернуться на родину. При поддержке Рокфеллеровского фонда и Х.Т. Моргана ему удалось получить работу в США, и до конца своей научной карьеры Дельбрюк оставался американским ученым, работая в университете Вандербильдта в Нэшвилле, а затем снова в Калтехе [47, 109].

В 1938 г. в Калтехе Дельбрюк встретился с Эмори Эллисом (Emory Ellis; 1906–2003). Эллис получил персональную стипендию для исследований в области канцерогенеза. Считая, что в развитии рака принимают участие вирусы, он решил пролить свет на фундаментальную природу последних. Однако в качестве модельного объекта он выбрал именно бактериофаги, поскольку работать с ними было гораздо проще, чем с вирусами животных или растений. Эллис показал Дельбрюку свои эксперименты по демонстрации жизненного цикла бактериофага (первые версии эксперимента единичного цикла роста), которые настолько впечатлили Дельбрюка, что он переключился на работу с бактериофагами совместно с Эллисом. В 1939 г. они опубликовали статью «The growth of bacteriophage» [110]. Эта работа далеко выходит за рамки простого эксперимента единичного цикла роста и представляет собой, в сущности, тщательную количественную калибровку выбранной экспериментальной системы, позволяющую не только дать строгую интерпретацию результатов, но и заложить основу для дальнейших исследований на ее основе. Эллис и Дельбрюк оценили влияние разных факторов (температура, плотность газона бактерий, концентрация агара, время контакта бактерий и фагов до посева) на результаты титрования фага, что позволило им опровергнуть имевшиеся в то время сообщения о сложной зависимости числа бляшек от разведения (которое косвенно давало поддержку теории трансмиссивного автолиза Бордэ). Авторы учли также такой фактор, как эффективность посева (efficiency of plating), и экспериментально показали, что в их условиях эффективность посева составляет 0,4–0,5 бляшки на одну фаговую частицу (точнее, на 1 минимальную заражающую дозу в жидкой культуре). Наконец, авторы исследовали саму кривую роста фага в разных условиях, изучили разброс урожая фаговых частиц в отдельных клетках, определили константу адсорбции использованного вируса. Таким образом, хотя формально основной результат этой работы практически повторяет наблюдение д'Эрелля о том, что рост бактериофагов происходит не непрерывно, а «толчками», методологически она была прорывом на принципиально новый уровень.

В отличие от Бордэ и сторонников его теории, включая Дж. Нортропа, опубликовавшего свое исследование в том же 1939 г. [111], Дельбрюк справедливо считал главным проявлением деятельности бактериофага не лизис клеток и культур бактерий, но репродукцию частиц вируса. С первых дней знакомства с техникой посева фага в лаборатории Эллиса Макс Дельбрюк пол-

ностью принял концепцию, что бляшка – это макроскопический результат размножения отдельной частицы бактериофага: «Я был совершенно ошеломлен тем, что существует такая простая процедура, чтобы визуализировать частицы вируса... Это было за пределами моих самых диких мечтаний о простых экспериментах на чем-то подобном атому в биологии» (цит. по книге Fischer и Lipson [109]).

Именно этот процесс репликации бактериофага стал центром научных интересов Дельбрюка на ближайшее десятилетие. Вслед за смелыми предположениями Нильса Бора он видел в этом внешне несложном явлении возможное проявление некой комплементарности, основанной, возможно, на квантово-механических явлениях. Однако в руках исследователей была лишь методика титрования, которая позволяла визуализировать фаг до его взаимодействия с клеткой и после выхода из нее. Инфицированная фагом клетка оставалась «черным ящиком».

Дельбрюк начинает свои собственные эксперименты с целью дальнейшей «калибровки» экспериментальной системы, изучив особенности адсорбции фага на клетки и влияние различных факторов на этот процесс [112]. Он показал, что после адсорбции на клетке-хозяине вирус перестает быть чувствителен к нейтрализующим антителам, т.е. проникает в клетку [113], прояснил вопрос об истинной взаимосвязи лизиса и репродукции фага [114].

С 1940 г. М. Дельбрюк начинает сотрудничество с Сальватором Луриа, а с 1943 г. к ним присоединился Альфред Херши. Эти трое ученых и составили первоначальную Фаговую группу, к которой впоследствии присоединились и другие коллеги. Для того чтобы добиться сопоставимости результатов разных лабораторий, Дельбрюк совместно с Дорманом формирует коллекцию «авторизованных» фагов – знаменитую Т-серию (1944 г.), призывая исследователей присоединиться к так называемому «фаговому договору» и выполнять свои эксперименты именно на этих вирусах. Интересно, что Дельбрюк сознательно не включил в Т-серию ни одного умеренного фага.

В 1943 г. (технически номер журнала *Genetics* вышел в начале 1944 г.) Луриа и Дельбрюк публикуют, вероятно, наиболее известную свою работу – флуктуационный тест [115] – показавшую, что мутации устойчивости бактерий к фагам возникают до контакта с вирусом, т.е. работает дарвиновский, а не ламарковский механизм эволюции. Идея флуктуационного теста заключалась в том, что если устойчивость возникает в ответ на воздействие фага, то при посеве на фаговый агар множества культур, являющихся результатом размножения единственной клетки, или небольшого числа клеток, как в реальности было в эксперименте Луриа и Дельбрюка, число вырастающих колоний устойчивых бактерий будет флуктуировать, подчиняясь нормальному распределению. В том случае, если мутации возникают независимо от контакта с фагом, в небольшом числе культур они возникнут на ранней стадии роста, и к моменту посева будут составлять очень большую долю популяции. Таким образом, число пробирок, в которых количество мутантов резко больше среднего, будет выше, чем предсказывается нормальным распределением. Дельбрюк разработал соответствующую математическую модель и статистический тест, позволяющий соотнести данные с предсказаниями по обоим вариантам. На основании анализа сотен повторностей авторы доказали, что выполняются предсказания дарвиновской модели. Интересно, что в 1940-е гг. наличие хромосом и генов у бактерий еще не было широко признано, поэтому значение этой публикации для генетики микроорганизмов существенно выходило за рамки проблемы механизмов эволюции. В 1949 г. этот результат был подтвержден Newcombe [116], поставившим более наглядный эксперимент без использования сложного математического аппарата. После посева бактерий на чашки Newcombe проинкубировал их несколько часов, чтобы образовались микроколонии. После этого он перераспределил бактерии на некоторых чашках, втирая в них небольшое количество стерильного физиологического раствора. После этого чашки с перераспределенной биомассой и чашки с интактными микроколониями были опрысканы из пульверизатора суспензией фага T1. Очевидно, что если бы мутации устойчивости возникали вследствие контакта с фагом, то перераспределение биомассы не оказало бы влияния на число устойчивых колоний. Однако в реальности на «перераспределенных» чашках рост устойчивых бактерий был значительно более интенсивным, что соответствовало предсказаниям дарвиновской модели.

Важнейшим достижением эксперимента Луриа и Дельбрюка было не столько ниспровержение последнего оплота ламаркизма (в адаптации бактерий), сколько доказательство того, что у бактерий имеют место истинные мутации, возникающие до действия силы отбора. Как мы уже видели, сам по себе этот факт был многократно продемонстрирован ранее [35], однако методологическое совершенство работы Luria и Delbruck [115] было настолько убедительным, что в «коллективной мифологии» научного сообщества [12] именно эта публикация воспри-

нималась как рождение генетики бактерий. Тем не менее с точки зрения научной программы Дельбрюка это было отклонением от главной линии работы.

В это же время Луриа и Дельбрюк начинают сотрудничать с Т. Андерсоном, который получил в свое распоряжение один из первых электронных микроскопов. Полученные Luria и Anderson [117] в 1942 г. изображения частиц (вероятно, Т-четного) бактериофага позволили установить, что они имеют вполне определенную морфологию головастика с шестиугольной головкой и хвостовым отростком, при этом размер этих частиц (~ 0,06 × 0,2 мкм) вполне соответствовал сделанным ранее биофизическим оценкам (см. выше). Когда авторы показали свои фотографии Дж. Бронфенбреннеру, тот воскликнул: «Мейн Готт! У них есть хвосты!» (цит. по книге Fischer и Lipson [109]). Таким образом, именно Бронфенбреннера, по-видимому, нужно считать автором термина «хвостатые бактериофаги». Важно отметить, что приоритет электронно-микроскопической визуализации фагов принадлежит, несомненно, Ruska [50], см. также обзор Kruger et al. [51], но из-за войны опубликованные в немецких журналах работы не были доступны в США.

В дальнейшем, используя электронный микроскоп, Луриа, Андерсен и Дельбрюк подтвердили основные этапы жизненного цикла фага, вычисленные им по кривым единичного цикла роста, и также показали, что фаговая частица не проникает внутрь инфицированной клетки, а остается снаружи в течение всего латентного периода.

Стараясь раскрыть суть происходящего в инфицированной клетке, участники Фаговой группы использовали несколько различных подходов. Так, в чрезвычайно изящной работе Luria и Latarjet [118], изучая зависимость инактивации ультрафиолетом инфицированных фагом клеток, взятых в разные моменты после инфекции, от дозы облучения, заметили, что расчетная чувствительность (гипотетического) единичного фага внутри инфицированной клетки сначала падает, а ближе к моменту лизиса вновь возрастает. Авторы интерпретировали этот как первоначальное накопление экранирующего вещества (нуклеиновой кислоты), которое затем «тратится на синтез бактериофага». Отметим, что к этому моменту участникам Фаговой группы уже была известна классическая работа Avery et al. [119], показавших, что ДНК, как минимум, имеет некоторое отношение к механизму наследственности, будучи фактором, отвечающим за трансформацию пневмококков. Таким образом, Луриа и Латаржи описали особый период существования бактериофага в клетке, не сводимый к простому наличию вирусных частиц внутри бактерии. Существование эклипс-периода было подтверждено в 1950 г. работами Doermann [120] и Anderson и Doermann [121], применившими целый набор методов для преждевременного разрушения инфицированных клеток (обработка цианидом, лизис извне высокими дозами фага Т6, ультразвуковое разрушение). Впоследствии в практику вошел лизис с помощью хлороформа [122], который употребляют и до нашего времени.

Чуть ранее Дельбрюк попытался вызвать преждевременный лизис инфицированных клеток, используя ко-инфекцию бактериофагами с разной длительностью латентного периода (подход, аналогичный работе Burnet и McKie [61] по искусственному лизису лизогенных бактерий!). Однако вместо ожидаемого лизиса Дельбрюк обнаружил взаимное исключение (интерференцию) бактериофагов – при заражении одной клетки разными фагами успешно размножался только один из них [123]. Это явление (механизмы которого не всегда ясны и в наше время) очень увлекло Дельбрюка, так как он видел в нем возможное проявление той самой квантовой комплементарности, которая, как он предполагал, лежит в основе репликации вируса (термины «взаимное исключение» и «интерференция» заимствованы им из физики). В 1946 г. исследования Delbrück и Bailey [124] и, независимо от них, Hershey [125] результатов заражения клетки разными вариантами (первоначально использовали полученные Luria [126] мутанты фага по спектру хозяев) обнаружили появление гибридных бактериофагов, т.е. наличие у фагов рекомбинации [127]. Таким образом, удалось не только доказать существование генов у вирусов бактерий, но и привести эти объекты в сферу действия приемов генетического анализа, хорошо разработанных на классических объектах генетики (как мы видели выше, практически одновременно генетический анализ удалось применить и к бактериям). Таким образом, концепция вируса как трансмиссивного гена, а точнее генетической программы, состоящей из нескольких генов, получила строгие экспериментальные доказательства, хотя физическая природа гена была в тот момент еще не известна. Сочетание двух упомянутых подходов (облучения ультрафиолетом и множественных инфекций) привело к открытию реактивации убитого ультрафиолетом бактериофага при множественном инфицирофании клетки [128] – механизм, известный ныне как рекомбинационная репарация. В дальнейшем использование в качестве модельных объектов *rII*-

мутантов Т-четных бактериофагов, открытых Hershey [125, 129] привело к существенному прогрессу в понимании структуры гена благодаря ставшим классическими работам еще одного участника Фаговой группы – Сеймура Бензера [Seymour Benzer (1921–2007)] [130]. Важным преимуществом этой системы было то, что, помимо формирования *rII*-мутантами фага Т4 особых крупных бляшек, эти мутанты были не способны к росту на штамме *E. coli* K-12, лизогенном по фагу λ. В то же время фаг Т4 дикого типа нормально растет на этом хозяине (этот эффект связан с тем, что гены *rIIAB* позволяют преодолеть действие антифаговой системы *rexAB*, кодируемой профагом λ). Поэтому образование даже минимального количества частиц дикого типа в результате скрещивания двух разных *rII* мутантов было легко обнаружить. Помимо скрещиваний фагов Бензером был предложен так называемый *цис-транс* тест, основанный на комплементации белковых продуктов при совместном заражении клетки мутантами по разным генам, но не разными мутантами по одному и тому же гену [130], что позволило очертить методами высокоразрешающего генетического картирования границы отдельных генов или, в терминологии Бензера, цистронов (в частности, *rIIA* и *rIIB*). Достигнутая разрешающая способность генетического картирования *rII*-области даже позволила Crick et al. [131] вычислить основные свойства генетического кода, используя исключительно результаты скрещиваний ряда *rII*-мутантов!

Последним штрихом для формирования современной концепции вируса стал широко известный эксперимент Hershey и Chase [132], которые в 1952 г., используя радиоактивную метку, показали, что при инфекции фагом Т2 практически весь белок фаговой частицы, помеченный радиоактивной серой, остается снаружи клетки, а меченная фосфором ДНК полностью проникает в клетку. Это доказывало, что ДНК не только отвечает за *некоторые* гены (что было показано Avery et al. [119] в 1944 г.), но является носителем *всех* генов сложной генетической программы репродукции бактериофага.

В следующем 1953 г. Дж. Уотсон, работавший ранее под руководством С. Луриа, и Ф. Крик опубликовали их знаменитую модель структуры ДНК, что позволило вышеприведенной концепции быстро стать общепринятой.

Немалую роль в быстром принятии новой концепции вируса сыграли и непосредственные усилия Фаговой группы по распространению (или, выражаясь современным языком, продвижению) своих подходов в научном сообществе. С 1945 г. в лаборатории Колд Спринг Харбор (CSH) был организован практический курс по работе с бактериофагами, который в 1945–1946 гг. вел сам Дельбрюк с помощью двух своих студентов (с 1947 г. курс вел А. Новик). Также существенное влияние оказала летняя конференция (семинар) по бактериофагам и молекулярной генетики в Колд Спринг Харбор, которая продолжается и поныне. Важно отметить, что помимо научных стандартов М. Дельбрюку удалось создать на этих мероприятиях атмосферу неформального и дружественного научного общения, которая характерна для большинства конференций по бактериофагам и в наши дни.

Таким образом, подводя итог, можно отметить, что природа вируса как особой формы жизни, представляющей собой трансмиссивную генетическую программу, была выяснена в результате исследований жизненных циклов бактериофагов. Интересно, что эта работа шла практически параллельно со стороны исследователей лизогении (решающий вклад в которые сделали А. Львов, а также группа Дж. Ледерберга), а также исследований литического цикла на модели фагов Т-серии, осуществленных Фаговой группой, вдохновляемой харизматическим лидером в лице М. Дельбрюка.

ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ БИОЛОГИИ БАКТЕРИОФАГОВ

Начиная с 1960-х гг. исследования бактериофагов перестали быть результатом усилий относительно небольшого числа микробиологов, вирусологов и генетиков, но превратились в одно из важнейших направлений биологической науки, с большим количеством лабораторий и действующих лиц.

Интенсивные исследования небольшого набора модельных объектов позволили еще в 1950–1960 гг. выяснить основные закономерности морфогенеза вирусных частиц, что стало возможным не только благодаря прогрессу методов электронной микроскопии, но и в результате создания методов работы с условно-летальными мутантами бактериофагов, дефектными по синтезу различных морфогенетических белков. Заражая такими мутантами клетки бактерий в непермиссивных условиях (или используя непермиссивные штаммы хозяев, лишенные соответствующих супрессорных генов), удавалось получить в достаточном количестве промежуточные продукты морфогенеза [49].

В 1960–1980 гг. были открыты большинство семейств нехвостатых бактериофагов, некоторые из которых стали важными модельными

объектами молекулярной биологии (например, РНК-содержащий фаг MS2 семейства Leviviridae, содержащие одноцепочечную ДНК фаги φX174 (Microviridae) и нитчатый фаг M13 (Inoviridae) [2, 133]). Фаг φX174 стал первым организмом, геном которого был полностью секвенирован в 1977 г. [134].

В дальнейшем исследования взаимодействий фаг-клетка дали большую часть инструментария генной инженерии (эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу, системы сайт-специфической рекомбинации, а позднее CRISPR-Cas редактирование геномов [133]. В 1985 г. были разработаны методы фагового дисплея, за создание которых в 2018 г. Г. Смиту и сэру Г. Винтеру присуждена Нобелевская премия по химии [135].

С конца 1990 гг. биология бактериофагов постепенно переключается с детального изучения немногочисленных классических модельных систем [136] на широкое исследование биоразнообразия вирусов прокариот (к бактериофагам добавились вирусы архей, активно изучаемые с 1990-х гг.). Резкое расширение спектра объектов стало возможным благодаря развитию методов геномики и метагеномики, биоинформатического анализа, а также более производительных подходов структурной вирусологии, таких, как криоэлектронная реконструкция и криоэлектронная томография. В этот же период стала очевидной существенная роль вирусов бактерий и архей в экологии большинства природных экосистем [137].

Глубокое изучение вопросов экологии и совместной эволюции бактерий и фагов, открытие и характеристика родственных бактериофагам клеточных структур бактерий, а также большое число открытых примеров кооперативного взаимодействия бактерий и фагов (в особой степени это касается умеренных вирусов) и другие открытия в сущности изменили представления о вирусах бактерий как о молекулярных паразитах. Современные представления о взаимодействиях бактериофагов и их хозяев изобилуют примерами, когда такое взаимодействие оказывается выгодно не только вирусу, но и хозяину, причем соответствующие эффекты описаны на всех уровнях организации, от отдельных генов и геномов до экосистем и биосферы в целом. Таким образом, можно утверждать, что отношения типа паразитизма являются лишь частным проявлением феномена бактериофагии, являющегося одной из фундаментальных основ существования микробной жизни на нашей планете [2, 133, 136, 137].

Однако автор считает преждевременным детальное рассмотрение истории этих исследований ввиду того, что эта история творится непосредственно на наших глазах, и автор считает невозможным выделить наиболее существенные работы и открытия (автоматически исключив из числа существенных все другие). Возможно, это будет более уместно сделать спустя еще несколько десятилетий, когда большинство ученых, работавших в этой области в данный период времени, сойдут со сцены.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-14-50503).

Благодарности. Автор благодарен Е.Е. Куликову за ценные замечания и помощь в оформлении рукописи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stent, G. S. (1960) *Papers on Bacterial Viruses*, Boston, Mass., pp. 365, doi: 10.1126/science.134.3471.44-c.
2. Летаров А. В. (2019) *Современные концепции биологии бактериофагов*, ДеЛи, М.
3. Шлегель Г. Г. (2020) *История микробиологии*, URSS, M.
4. Debré, P. (1998) *Louis Pasteur*, John Hopkins University Press, Baltimore.
5. Lakhtakia, R. (2014) The legacy of Robert Koch: surmise, search, substantiate, *Sultan Qaboos Univ. Med. J.*, **14**, e37-e41, doi: 10.12816/0003334.
6. Blevins, S. M., and Bronze, M. S. (2010) Robert Koch and the “golden age” of bacteriology, *Int. J. Infect. Dis.*, **14**, e744-e751, doi: 10.1016/j.ijid.2009.12.003.
7. Winau, F., and Winau, R. J. M. (2002) Emil von Behring and serum therapy, *Microbes Infect.*, **4**, 185-188, doi: 10.1016/s1286-4579(01)01526-x.
8. Киценко О. С., Киценко Р. Н., Белова Л. И. (2015) Проблемы медицинского обеспечения Красной Армии в годы Великой Отечественной войны (по свидетельствам медиков Сталинграда), *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*, **53**, 86-88.
9. Silva, M. (2018) From Bombay to Rio de Janeiro: the circulation of knowledge and the establishment of the Manguinhos laboratory, 1894-1902, *Hist. Cienc. Saude Manguinhos*, **25**, 639-657, doi: 10.1590/S0104-59702018000400003.
10. URL: URL: http://www.samoupravlenie.ru/37-10.php.
11. Van Kammen, A. (1999) Beijerinck’s contribution to the virus concept – an introduction, *Arch. Virol. Suppl.*, **15**, 1-8, doi: 10.1007/978-3-7091-6425-9_1.
12. Summers, W. C. (1991) From culture as organism to organism as cell: historical origins of bacterial genetics, *J. Hist. Biol.*, **24**, 171-190, doi: 10.1007/BF00209428.

13. Ivanovski, D. (1892) Über die mosaikkrankheit der tabakspflanze, *Bulletin scientifique publié par l'Académie impériale des sciences de Saint-Pétersbourg*, **35**, 67-70.
14. Loeffler, F., and Frosch, P. (1898) Report of the commission for research on foot-and-mouth disease, *Zent. Bakt. Parasitkde. Abt. I*, **23**, 371-391.
15. Ивановский Д. И. (1892) Мозаичная болезнь табака, *Труды Варшавского университета*, **6**, 49-72.
16. Жирнов О. П., Георгиев Г. П. (2017) Д.И. Ивановский – первооткрыватель вирусов как новой формы биологической жизни, *Вестник Российской академии медицинских наук*, **72**, 84-86.
17. Los, M., Czyz, A., Sell, E., Wegrzyn, A., Neubauer, P., and Wegrzyn, G. (2004) Bacteriophage contamination: is there a simple method to reduce its deleterious effects in laboratory cultures and biotechnological factories? *J. Appl. Genet.*, **45**, 111-120.
18. Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., and Mazure, H. (2011) Bacteriophage prehistory: is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*, **1**, 174-178, doi: 10.4161/bact.1.3.16591.
19. Hankin, E. H. (1896) The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes, *Ann. Inst. Pasteur*, **10**, 511-523.
20. Гамалея Н. Ф. (1898) Бактериолизины – ферменты, разрушающие бактерии, *Русский архив патологии*, 607-613.
21. Bardell, D. (1982) An 1898 report by Gamaleya for a lytic agent specific for Bacillus anthracis, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **37**, 222-225, doi: 10.1093/jhmas/xxxvii.2.222.
22. Thomas, G. H. (2014) *Frederick William Twort: not just bacteriophage*, in Microbiology Society.
23. Twort, F. W. (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses, *Lancet*, **186**, 1241-1243.
24. Кунин Е. В. (2017) *Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции*, ЗАО «Центрполиграф», Москва.
25. Twort, F. W. (1936) Further investigations on the nature of ultra-microscopic viruses and their cultivation, *J. Hyg. (Lond)*, **36**, 204-235, doi: 10.1017/s0022172400043606.
26. Dublanchet, A. (2017) *Autobiographie de Félix d'Hérelle. Les pérégrinations d'un bactériologiste*, Lavoisier, Paris.
27. Summers, W. C. (2016) Felix Hubert d'Herelle (1873-1949): history of a scientific mind, *Bacteriophage*, **6**, e1270090, doi: 10.1080/21597081.2016.1270090.
28. D'Hérelle, F. (2007) On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917, *Res. Microbiol.*, **158**, 553, doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005.
29. D'Hérelle, F. (1921) *Le bactériophage; son rôle dans l'immunité*, Masson et cie, Paris.
30. Д'Эрелль, Ф. (1926) *Бактериофаг и его значение для иммунитета*, (пер. под ред. [и с предисл.] проф. С. В. Коршуна), Гос. Изд-во, Москва, Ленинград.
31. D'Hérelle, F. (1931) An address on bacteriophagy and recovery from infectious diseases, *Can. Med. Assoc. J.*, **24**, 619-628.
32. Schmalstieg, F. C., Jr., and Goldman, A. S. (2009) Jules Bordet (1870-1961): a bridge between early and modern immunology, *J. Med. Biogr.*, **17**, 217-224, doi: 10.1258/jmb.2009.009061.
33. D'Hérelle, F., and Smith, G. H. (1926) *The bacteriophage and its behavior*, The Williams & Wilkins Company, p. 629.
34. Billiau, A. (2016) At the centennial of the bacteriophage: reviving the overlooked contribution of a forgotten pioneer, Richard Bruynoghe (1881-1957), *J. Hist. Biol.*, **49**, 559-580, doi: 10.1007/s10739-015-9429-0.
35. Gratia, A. (1921) Studies on the d'Herelle phenomenon, *J. Exp. Med.*, **34**, 115-126, doi: 10.1084/jem.34.1.115.
36. Bordet, J., and Ciuca, M. (1921) Remarques sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **84**, 745-747.
37. McKinley, E. B. (1925) Sérum antilytique obtenu par immunisation contre une bactйrie normale, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **93**, 1050-1052.
38. Northrop, J. H., and Krueger, A. P. (1932) The role of intracellular bacteriophage in lysis of susceptible staphylococci, *J. Gen. Physiol.*, **15**, 329-332, doi: 10.1085/jgp.15.3.329.
39. Northrop, J. H. (1937) Chemical nature and mode of formation of pepsin, trypsin and bacteriophage, *Science*, **86**, 479-483, doi: 10.1126/science.86.2239.479.
40. Bordet, J. B. V. (1931) Croonian Lecture. – The theories of the bacteriophage, *Proc. R. Soc. Ser. B*, **107**, 398-417, doi: 10.1098/rspb.1931.0005.
41. Appelmans, R. (1921) Le dosage du bactériophage, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **85**, 701.
42. Gratia, J.-P. (2000) Andre Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics, *Genetics*, **156**, 471-476.
43. Gratia, A. (1922) The Twort-d'Herelle phenomenon: II. Lysis and microbic variation, *J. Exp. Med.*, **35**, 287-302, doi: 10.1084/jem.35.3.287.
44. Summers, W. C. (1991) On the origins of the science in Arrowsmith: Paul de Kruif, Felix d'Herelle, and phage, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **46**, 315-332, doi: 10.1093/jhmas/46.3.315.
45. Gratia, A. (1936) Des relations numeriques entre bacteries lysogènes et particules de bactériophage, *Ann. Inst. Pasteur*, **57**, 652-676.
46. Muller, H. J. (1922) Variation due to change in the individual gene, *Am. Naturalist*, **56**, 32-50.
47. Summers, W. C. (1993) How bacteriophage came to be used by the Phage Group, *J. Hist. Biol.*, **26**, 255-267, doi: 10.1007/Bf01061969.
48. Schlesinger, M. (1934) Zur frage der chemischen zusammensetzung des bakteriophagen, *Biochem. Z.*, **273**, 306.
49. Grafe, A. (1991) *A history of experimental virology*, Springer-Verlag, Berlin; New York.
50. Ruska, H. (1940) Die Sichtbarmachung der bakteriophagen lyse im Übermikroskop, *Naturwissenschaften*, **28**, 45-46.
51. Kruger, D. H., Schneck, P., and Gelderblom, H. R. (2000) Helmut Ruska and the visualisation of viruses, *Lancet*, **355**, 1713-1717, doi: 10.1016/s0140-6736(00)02250-9.
52. Kirchhelle, C. (2019) The forgotten typers: the rise and fall of Weimar bacteriophage-typing (1921–1935), *Notes Records*, doi: 10.1098/rsnr.2019.0020.
53. Lwoff, A. (1953) Lysogeny, *Bacteriol. Rev.*, **17**, 269-337.
54. Otto, R., and Munter, H. (1921) Zum d'Herelleschen Phänomen, *Dtsch. Med. Wchnschrft*, **47**, 1579.
55. Otto, R., and Munter, H. (1923) Weitere untersuchungen zum d'Herelleschen Phänomen, **100**, 402-415.
56. Bail, O. (1922) Elementarbakteriophagen des Shigabacillus, *Wien. Klin. Wochenschr.*, **35**, 722-724.
57. Gildmeister, E., and Herzberg, K. (1924) Zur theorie der bakteriophagen (d'Herelle Lysine). 6. Mitteilung über das d'Herellesche phanomen, *Zentr Bakteriol Parasitenk I Abt. Orig.*, **93**, 402-420.
58. Bail, O. (1925) Der Kolistamm 88 von Gildemeister und Herzberg, *Med. Klein.*, **21**, 1271-1273.

59. Bordet, J. (1925) Le problème de l'autolyse microbienne transmissible ou du bactériophage, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1-47.
60. Bordet, J., and Renaux, E. (1928) L'autolyse bacterienne transmissible ou le bacteriophage, *Ann. Inst. Pasteur*, **42**, 1283.
61. Burnet, F. M., and McKie, M. (1929) Observations on a permanently Lysogenic Strain of *B. enteritidis* gaertner, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **6**, 277-284.
62. Sankaran, N. (2010) The bacteriophage, its role in immunology: how Macfarlane Burnet's phage research shaped his scientific style, *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.*, **41**, 367-375, doi: 10.1016/j.shpsc.2010.10.012.
63. Burnet, F. M. (1934) The bacteriophages, *Biol. Rev.*, **9**, 332-350.
64. Dooren de Jong, E. D. (1931) Studien über Bakteriophagie. I. Über Bac. megatherium und den darin anwesenden Bakteriophagen, *Zentralbl. Bakter. Parasitenkund. Abt. I. Orig.*, **120**.
65. Wollman, E. (1928) Bactériophagie et processus similaires. Hérédité ou infection, *Bull. Inst. Pasteur*, **26**, 1-14.
66. Wollman, E. (1934) Bactériophagie (autolyse hérédocontagieuse) et bactériophages (facteurs lysogènes), *Bull. Inst. Pasteur*, **32**, 945-955.
67. Wollman, E., and Wollman, E. (1936) Régénération des bactériophages chez le B. megatherium lysogène, *CR Soc. Biol.*, **122**, 190-192.
68. Wollman, E., and Wollman, E. (1937) Les phases de bacteriophages (facteurs lysogènes), *CR Soc. Biol.*, **124**, 931-934.
69. Lwoff, A., and Gutmann, A. (1950) Recherches sur un *Bacillus megatherium* lysogene, *Ann. Ins.t Pasteur (Paris)*, **78**, 711-739.
70. Lwoff, A., Siminovitch, L., and Kjeldgaard, N. (1950) Induction of the production of bacteriophages in lysogenic bacteria, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **79**, 815-859.
71. Херш, А. Д. (1975) *Фаг лямбда*, Мир, Москва, с. 7-20.
72. Херши А. Д. (1975) *Фаг лямбда*, Мир, Москва, с. 21-64.
73. Gottesman, M. E., and Weisberg, R. A. (2004) Little lambda, who made thee? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 796-813, doi: 10.1128/MMBR.68.4.796-813.2004.
74. Hayes, W. (1980) Portraits of viruses: bacteriophage lambda, *Intervirology*, **13**, 133-153, doi: 10.1159/000149119.
75. Casjens, S. R., and Hendrix, R. W. (2015) Bacteriophage lambda: early pioneer and still relevant, *Virology*, **479-480**, 310-330, doi: 10.1016/j.virol.2015.02.010.
76. Lederberg, J., and Tatum, E. L. (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*, *Nature*, **158**, 558, doi: 10.1038/158558a0.
77. Lederberg, E. M. (1951) Lysogenicity in *E. coli* K-12, *Genetics*, **36**, 560-560.
78. Campbell, A. (2007) Phage integration and chromosome structure. A personal history, *Annu. Rev. Genet.*, **41**, 1-11, doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130240.
79. Lederberg, E. M., and Lederberg, J. (1953) Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*, *Genetics*, **38**, 51-64.
80. Wollman, E., and Jacob, F. (1957) Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *Escherichia coli*. 2. La localisation chromosomique du prophage-gamma et les consequences genetiques de l'induction zygotique, *Ann. Inst. Pasteur*, **93**, 323-339.
81. Ptashne, M. (1967) Isolation of the lambda phage repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 306-313, doi: 10.1073/pnas.57.2.306.
82. Пташне, М. (1988) *Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг лямбда*, Мир, М.
83. Zinder, N. D. (1992) Forty years ago: the discovery of bacterial transduction, *Genetics*, **132**, 291-294.
84. Morse, M. L., Lederberg, E. M., and Lederberg, J. (1956) Transduction in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*, **41**, 142-156.
85. Fruciano, D. E., and Bourne, S. (2007) Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, **18**, 19-26, doi: 10.1155/2007/976850.
86. Summers, W. C. (2012) The strange history of phage therapy, *Bacteriophage*, **2**, 130-133, doi: 10.4161/bact.20757.
87. Summers, W. C. (2001) Bacteriophage therapy, *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 437-451, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.437.
88. Almeida, G. M. F., and Sundberg, L. R. (2020) The forgotten tale of Brazilian phage therapy, *Lancet Infect. Dis.*, **20**, e90-e101, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30060-8.
89. Myelnikov, D. (2018) An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922-1955, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **73**, 385-411, doi: 10.1093/jhmas/jry024.
90. Gelman, D., Eisenkraft, A., Chanishvili, N., Nachman, D., Coppenhagem Glazer, S., and Hazan, R. (2018) The history and promising future of phage therapy in the military service, *J. Trauma Acute Care Surg.*, **85**, S18-S26, doi: 10.1097/TA.0000000000001809.
91. Chanishvili, N. (2012) Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches, *Adv. Virus Res.*, **83**, 3-40, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
92. Zaffiri, L., Gardner, J., and Toledo-Pereyra, L. H. (2012) History of antibiotics. From Salvarsan to cephalosporins, *J. Invest. Surg.*, **25**, 67-77, doi: 10.3109/08941939.2012.664099.
93. Summers, W. C. (1993) Cholera and plague in India: the bacteriophage inquiry of 1927-1936, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **48**, 275-301, doi: 10.1093/jhmas/48.3.275.
94. D'Hérelle, F., and Malone, R. H. (1927) A preliminary report of work carried out by the cholera bacteriophage enquiry, *Ind. Med. Gaz.*, **62**, 614-616.
95. D'Hérelle, F. (1929) Studies upon asiatic cholera, *Yale J. Biol. Med.*, **1**, 195-219.
96. D'Hérelle, F. (1931) Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections, *Bull. N Y Acad. Med.*, **7**, 329-348.
97. Kuhl, S. J., and Mazure, H. (2011) d'Hйrelle. Preparation of therapeutic bacteriophages, Appendix 1 from: *Le Phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses*: Masson et Cie, 1938, Paris–OCLC 5784382, *Bacteriophage*, doi: 10.4161/bact.1.2.15680.
98. Eaton, M. D., and Bayne-Jones, S. (1934) Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections, *J. Am. Med. Assoc.*, **103**, 1769-1776.
99. Krueger, A. P., and Scribner, E. J. (1941) The bacteriophage: its nature and its therapeutic use, *J. Am. Med. Assoc.*, **116**, 2269-2277.
100. Morton, H. E., and Engley, F. B., Jr (1945) Dysentery bacteriophage. Review of the literature on its prophylactic and therapeutic uses in man and in experimental infections in animals, *J. Am. Med. Assoc.*, **127**, 584-591.
101. Казарновская С. С. (1932) *Бактериофагия*, Издательство Академии Наук, Ленинград.

102. Цулукидзе А. (1941) *Опыт применения бактериофага в условиях военного травматизма*, Грузмедгиз, Тбилиси.
103. Покровская М. П., Каганова Л. С., Морозенко М. А., Булгакова А. Г., Скаценко Е. Е. (1941) *Лечение ран бактериофагом*, Медгиз, М.-Л.
104. Павлова Л. И., Сумароков А. А., Солодовников Ю. П., Никитюк Н. М. (1973) К вопросу о применении дизентерийного бактериофага в качестве средства профилактики дизентерии (обзор литературы), *Журн. микр. эпид. иммун.*, **50**, 27-32.
105. Солодовников Ю. П., Павлова Л. И., Гарнова Н. А., Ногтева Ю. Б., Сотемский Ю. С. (1971) Профилактическое применение сухого поливалентного дизентерийного бактериофага с пектином в детских дошкольных учреждениях. Сообщение 2. К обоснованию тактики и схемы применения бактериофага в современных условиях, *Журн. микр. эпид. иммун.*, **48**, 123-127.
106. Солодовников Ю. П., Павлова Л. И., Емельянов П. И., Гарнова Н. А., Ногтева Ю. Б., Сотемский Ю. С., Богдашич О. М., Аршинова В. В. (1970) Профилактическое применение сухого поливалентного дизентерийного бактериофага с пектином в дошкольных учреждениях. Сообщение 1. Результаты строго контролируемого эпидемиологического опыта (Ярославль, 1968), *Журн. микр. эпид. иммун.*, **47**, 131-137.
107. Jones, E. H., Letarov, A. V., and Clokie, M. (2020) Neat science in a messy world: the global impact of human behavior on phage therapy, past and present, *PHAGE*, **1**, 16-22.
108. *Phage and the origins of molecular biology* (1966) (Cairns, J., Stent, G. S., and Watson, J. D., eds), Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York.
109. Fischer, E. P., and Lipson, C. (1988) *Thinking About Science: Max Delbrück and the Origins of Molecular Biology*, Norton, New York.
110. Ellis, E. L., and Delbruck, M. (1939) The growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 365-384, doi: 10.1085/jgp.22.3.365.
111. Northrop, J. H. (1939) Increase in bacteriophage and gelatinase concentration in cultures of *Bacillus megatherium*, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 59-79, doi: 10.1085/jgp.23.1.59.
112. Delbrück, M. (1940) Adsorption of bacteriophage under various physiological conditions of the host, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 631-642, doi: 10.1085/jgp.23.5.631.
113. Delbrück, M. (1945) Effects of specific antisera on the growth of bacterial viruses (bacteriophages), *J. Bacteriol.*, **50**, 137-150.
114. Delbrück, M. (1940) The growth of bacteriophage and lysis of the host, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 643-660, doi: 10.1085/jgp.23.5.643.
115. Luria, S. E., and Delbruck, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, **28**, 491-511.
116. Newcombe, H. B. (1949) Origin of bacterial variants, *Nature*, **164**, 150, doi: 10.1038/164150a0.
117. Luria, S. E., and Anderson, T. F. (1942) The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **28**, 127-130, doi: 10.1073/pnas.28.4.127.
118. Luria, S. E., and Latarjet, R. (1947) Ultraviolet irradiation of bacteriophage during intracellular growth, *J. Bacteriol.*, **53**, 149-163.
119. Avery, O. T., Macleod, C. M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, **79**, 137-158, doi: 10.1084/jem.79.2.137.
120. Doermann, A. H. (1952) The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide, *J. Gen. Physiol.*, **35**, 645-656, doi: 10.1085/jgp.35.4.645.
121. Anderson, T. F., and Doermann, A. H. (1952) The intracellular growth of bacteriophages. II. The growth of T3 studied by sonic disintegration and by T6-cyanide lysis of infected cells, *J. Gen. Physiol.*, **35**, 657-667, doi: 10.1085/jgp.35.4.657.
122. Séchaud, J., and Kellenberger, E. (1956) Lyse précoce, provoquée par le chloroforme, chez les bactéries infectées par du bactériophage, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **90**, 102-106.
123. Delbrück, M. (1945) Interference between bacterial viruses; the mutual exclusion effect and the depressor effect, *J. Bacteriol.*, **50**, 151-170.
124. Delbrück, M., and Bailey, W. T. (1946) Induced mutations in bacterial viruses, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **11**, 33-37.
125. Hershey, A. D. (1946) Mutation of bacteriophage with respect to type of plaque, *Genetics*, **31**, 620-640.
126. Luria, S. E. (1945) Mutations of bacterial viruses affecting their host range, *Genetics*, **30**, 84-99.
127. Luria, S. E. (1948) Sex in bacteria and viruses, *Sci. Mon.*, **66**, 159-162.
128. Luria, S. E. (1947) Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage particles inside double-infected host cells, *J. Bacteriol.*, **54**, 79.
129. Hershey, A. D., and Rotman, R. (1949) Genetic recombination between host-range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacterial cells, *Genetics*, **34**, 44-71.
130. Benzer, S. (1955) Fine structure of a genetic region in bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 344-354, doi: 10.1073/pnas.41.6.344.
131. Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. J. (1961) General nature of the genetic code for proteins, *Nature*, **192**, 1227-1232, doi: 10.1038/1921227a0.
132. Hershey, A. D., and Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39-56, doi: 10.1085/jgp.36.1.39.
133. Salmond, G. P., and Fineran, P. C. (2015) A century of the phage: past, present and future, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 777-786, doi: 10.1038/nrmicro3564.
134. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X 174 DNA, *Nature*, **265**, 687-695, doi: 10.1038/265687a0.
135. Barderas, R., and Benito-Pena, E. (2019) The 2018 Nobel Prize in chemistry: phage display of peptides and antibodies, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 2475-2479, doi: 10.1007/s00216-019-01714-4.
136. Calendar, R. (2006) *The bacteriophages*, 2 edn., Oxford University Press, p. 746.
137. Weinbauer, M. G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses, *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 127-181, doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.

HISTORY OF EARLY BACTERIOPHAGE RESEARCH AND EMERGENCE OF THE KEY CONCEPTS IN VIROLOGY

Review

A. V. Letarov[1,2]

[1] *Winogradsky Institute of Microbiology, RC Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 117312 Moscow, Russia; E-mail: letarov@gmail.com*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia*

Received July 6, 2020
Revised August 2, 2020
Accepted August 2, 2020

Bacterial viruses – bacteriophages – were discovered 20 years after the discovery of plant and animal viruses; however, the first 40 years of bacteriophage studies had resulted in the establishment of modern concepts of virology and, to a great degree, formed the basis for emergence of molecular genetics and molecular biology. Certain aspects of early history of bacteriophage research have been described in detail in many special publications. In this review, we present a general timeline of the key events that have led to the establishment of main principles of virology. In particular, confrontation of the ideas of F. d'Herelle and J. Bordet on the bacteriophage nature is discussed together with the history of lysogeny phenomenon discovery and elucidation of its nature, works of the Delbrück's Phage Group in the USA, development of methodology for bacteriophage genetic analysis, and other studies that have paved the way to the recognition of the virus (bacteriophage) as a transmissive genetic program. The history of the early attempts of practical applications of bacteriophages, such as phage therapy and phage typing, is also presented.

Keywords: bacteriophages, history of studies, bacteriophage discovery, the Phage Group, discovery of lysogeny, history of phage therapy

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1213 – 1239

УДК 577.112.7

АМИЛОИДНЫЕ И АМИЛОИДОПОДОБНЫЕ АГРЕГАТЫ: МНОГООБРАЗИЕ И КРИЗИС ТЕРМИНА*

Обзор

© 2020 А.Б. Матиив[1], Н.П. Трубицина[1], А.Г. Матвеенко[1], Ю.А. Барбитов[1,2], Г.А. Журавлева[1,3], С.А. Бондарев[1,3]**

[1] *Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, 199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: stanislavspbgu@gmail.com, s.bondarev@spbu.ru*

[2] *Институт биоинформатики, 197342 Санкт-Петербург, Россия*

[3] *Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, научная лаборатория биологии амилоидов, 199034 Санкт-Петербург, Россия*

Поступила в редакцию 16.07.2020
После доработки 05.08.2020
Принята к публикации 05.08.2020

Активное накопление данных о новых амилоидах, которое сейчас происходит, размывает границы термина «амилоид». В настоящий момент он чаще всего используется для обозначения агрегатов с кросс-β структурой. При этом для ряда амилоидов показаны и другие необычные свойства, среди которых высокая устойчивость к действию детергентов и протеаз, взаимодействие со специфическими красителями, а также способность индуцировать переход некоторых белков из растворимой формы в агрегированную. Эти же черты обнаруживают и у агрегатов, лишенных кросс-β структуры, которые принято называть амилоидоподобными и объединять в одну группу, хотя их разнообразие очень велико. Мы собрали и систематизировали информацию о свойствах более двухсот известных амилоидов и амилоидоподобных белков, уделяя особое внимание наиболее противоречивым примерам. В частности, ряд белков в составе немембранных органелл формирует агрегаты с кросс-β структурой, морфологически неотличимые от других амилоидов, но полностью растворяющиеся в присутствии детергентов. Такие парадоксы демонстрируют необходимость уточнения существующего определения термина «амилоид». С другой стороны, демонстрация разнообразия структур амилоидоподобных агрегатов показывает актуальность создания их классификации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоиды, амилоидоподобные агрегаты, кросс-β структура, прионы.

DOI: 10.31857/S0320972520090043

КРАТКИЙ ОБЗОР РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ АМИЛОИДОВ

Термин «амилоид» был введен в научную литературу немецким ботаником Маттиасом Шлейденом. Одной из его идей было применение теста на крахмал в растениях для изучения химического и анатомического состава растительной клетки. Этот тест был первоначально описан в 1814 г. Жан-Жак Колином и Анри-Франсуа Готье де Клаубри и основан на реакции окрашивания в синий цвет крахмала в присутствии йода и серной кислоты. Анализируя препараты растений с помощью этой методики, Шлейден впервые использовал термин «амилоид» (от латинского слова «amylum», крахмал) в значении «крахмалоподобный» для обозначения «нормальной амилозной составляющей в растениях» [1].

Немецкий патологоанатом Рудольф Вирхов впервые применил термин «амилоид» в медицинской литературе. В 1854 г. он использовал слово «амилоид» для описания патологических отложений в нервной системе, которые показали цветную реакцию с йодом и серной кислотой. Из-за этого Вирхов был убежден, что эти структуры были идентичны крахмалу [1]. Позже Вирхов применил тест с использованием йода и сер-

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды; БАС – боковой амиотрофический склероз; Aβ – амилоид β; β2M – β2-микроглобулин; CRES – cystatin-related epididymal spermatogenic (amyloid); Ig-LC – легкая цепь иммуноглобулина; LC – low-complexity (domain); PrP – прионный белок; RAC – reversible amyloid core; RHIM – Rip homotypic interaction motif; TTR – транстиретина.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 9, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

ной кислоты к другим тканям с отложениями амилоидов [2]. Дальнейшие исследования амилоидов продолжались уже с применением гистологических красителей, таких как конго красный (1922 г.) и тиофлавин (1959 г.), которые использовали вместо йода [3].

Структурные исследования амилоидов начались в 1930-х гг. с использованием дифракции рентгеновских лучей. В 1935 г. Уильям Томас Астбери и Сильвия Дикинсон описали характерную рентгенограмму, позже названную «кросс-β». В 1959 г. Алан Коэн и Эван Калкинс с помощью электронного микроскопа наблюдали в тканях кролика и человека амилоидные отложения с фибриллярной структурой ~7,5–14 нм в ширину и ~100–1600 нм в длину [3]. Позднее удалось продемонстрировать, что β-тяжи в составе агрегатов ориентированы перпендикулярно оси фибрилл и образуют межмолекулярные β-слои. Просвет между β-тяжами в одном β-слое составляет 4,7–4,8 Å, а в составе протофибриллы присутствуют минимум два β-слоя, расстояние между которыми порядка 10 Å. В экспериментах по дифракции электронов или рентгеновских лучей такая регулярная структура формирует характерную картину с двумя меридиональными и двумя экваториальными отражениями [4].

Позднее были описаны другие необычные свойства амилоидных агрегатов. Например, некоторые из них слабее подвержены действию протеаз, чем тот же белок в нативной форме [5], а также очень стабильны и не растворяются в присутствии детергентов. Для изучения амилоидов дрожжей были предложены методики на основе разнообразных модификаций электрофореза. Сегодня они успешно применяются для демонстрации устойчивости к детергентам или протеазам у амилоидов различного происхождения [6].

Большинство амилоидов способно индуцировать агрегацию растворимых молекул белка, из которого они состоят. Динамику этого процесса чаще всего анализируют *in vitro* с использованием очищенных белков и амилоид-специфических красителей [7]. Эта особенность является необходимой (но недостаточной) для существования инфекционных амилоидов, или прионов, первым обнаруженным примером которых стал PrP [8]. Обнаружение прионов дрожжей, присутствие которых в клетке можно отслеживать по росту на селективных средах [9], позволило разработать универсальные системы для поиска белков с аналогичными свойствами *in vivo* [10, 11] и идентификации новых амилоидов [12]. Последнюю задачу также позволяет решать методика C-DAG (curli-dependent amyloid generator), с ее помощью образование амилоидных агрегатов исследуемым белком оценивают по появлению фибрилл на поверхности клеток бактерий [13].

Существует ряд примеров агрегатов, для которых показаны некоторые из описанных выше свойств: фибриллярная морфология, взаимодействие с тиофлавином T или его аналогами, способность индуцировать агрегацию, устойчивость к детергентам и протеазам. Такие агрегаты мы будем далее называть амилоидоподобными, а белки, для которых хотя бы *in vitro* показано окрашивание конго красным или наличие кросс-β структуры, – амилоидами [4, 14–17].

МНОГООБРАЗИЕ АМИЛОИДОВ

С целью осветить многообразие белков, которые могут формировать амилоидные или амилоидоподобные агрегаты, мы собрали информацию о свойствах более двухсот таких белков. Мы старались включить максимальное число примеров, среди которых есть спорные, чтобы продемонстрировать разнообразие феномена и степень его изученности. Полная информация о рассмотренных белках представлена в таблице S в Приложении. В ней собрана информация о фрагментах, изоформах и заменах в анализируемых белках, но в рамках анализа данных мы вынуждены рассматривать только обобщенные сведения для отдельных белков, причем без учета уровня продукции в клетках и других различий в модельных системах. Скорее всего, представленный список может быть дополнен, но мы считаем эту выборку достаточно репрезентативной для того, чтобы оценить полноту описания амилоидных свойств разных белков с методологической точки зрения. К амилоидным свойствам мы причислили способность белка или его фрагмента формировать агрегаты *in vitro* или *in vivo*, наличие у этих агрегатов фибриллярной структуры, способность индуцировать агрегацию себе подобных белков, повышенную устойчивость агрегатов к детергентам и протеазам, их взаимодействие с амилоид-специфическими красителями тиофлавином и конго красным, а также наличие кросс-β структуры. Эти свойства в той или иной мере были описаны для многих амилоидов [17–19]. Поскольку существует мнение, что при правильно подобранных условиях можно получить амилоидную форму абсолютно любого белка [20], в ходе анализа этих данных мы не рассматривали белки, агрегаты которых были исследованы исключительно *in vitro*, то есть ни одно из перечисленных амилоидных свойств не было продемонстрировано в живых

организмах. Также мы не рассматривали белки, которые были выявлены в результате различных скринингов, но не были проверены адресно.

Существует масса примеров агрегатов, напоминающих по свойствам амилоиды. Тем не менее их исследования крайне гетерогенны с точки зрения методологических подходов. Для иллюстрации этого мы собрали информацию о восьми свойствах, характерных для белковых агрегатов, рассмотренных в этом разделе (рис. 1):

– наличие кросс-β структуры (характерная картина дифракции электронов или рентгеновских лучей с двумя отражениями, либо определение структуры агрегатов с помощью методов криоэлектронной микроскопии или ядерного магнитного резонанса);

– окрашивание конго красным (в том числе двойное лучепреломление в поляризованном свете);

– окрашивание тиофлавином Т или аналогами;

– фибриллярная морфология агрегатов;

– способность индуцировать агрегацию такого же белка;

– устойчивость к действию протеаз;

– устойчивость к обработке детергентами;

– образование агрегатов (продемонстрированное любым способом, кроме методов, использованных для демонстрации предыдущих свойств).

Для большинства белков, которые попали в наш анализ, были успешно показаны от двух до пяти перечисленных свойств (рис. 1, *а*). Примечательно, что среди проверок наиболее популярной является окрашивание тиофлавином Т, либо его аналогами (65% от всех белков). При этом конго красный, который в ряде работ называют «золотым стандартом» для демонстрации амилоидных свойств, используют гораздо реже (45% белков). Окрашивание конго красным считается более строгим доказательством амилоидных свойств и в том числе используется для демонстрации кросс-β структуры. Однако эта методика может давать ложноположительные результаты. В частности, некоторые мономерные белки, имеющие структуру глобулы или β-соленоида (один из вариантов структуры амилоидных агрегатов [4]), а также частично свернутые белки связывают конго красный *in vitro* [3, 21]. Кроме этого, при окрашивании препаратов тканей краситель может взаимодействовать с волокнами коллагена, внеклеточными фибриллами, а также белками цитоскелета и даже демонстрировать двойное лучепреломление [21, 22]. Взаимодействие агрегатов с тиофлавином Т в принципе нельзя считать универсальным доказательством наличия кросс-β структуры, поскольку, например агрегаты PSM3α с кросс-α структурой связывают этот краситель [23].

Наличие кросс-β структуры с помощью биофизических подходов показано менее чем для трети из проанализированных белков (27%). Впрочем, объединение двух множеств (окрашивание конго красным и наличие кросс-β структуры) включает 53% от проанализированных белков (120 из 226 примеров). Их в рамках наиболее распространенного сейчас определения мы можем назвать амилоидами. В этом подмножестве наиболее популярным набором проверок стало сочетание окрашивания амилоид-специфическими красителями и демонстрация фибрилл (рис. 1, *б*). Любопытно, что на втором месте оказываются примеры, для которых показано только окрашивание конго красным. Вопрос о том, является ли такая проверка достаточной сама по себе, остается открытым. Также важно отметить, что большинство экспериментов выполнено на различных модельных системах, и доказательства того, что нативный белок формирует амилоидные агрегаты в живых организмах в естественных условиях и при базовом уровне продукции, обычно отсутствуют. Такая проблема существует даже в случае хорошо исследованных белков, например амилоидных прионов дрожжей.

Для удобства описания все многообразие агрегатов мы разделили на три группы: (1) патологические, (2) функциональные и (3) амилоиды с неопределенной биологической ролью, в каждой из которых мы выделили несколько подгрупп. Несмотря на то что аналогичная классификация используется часто, такое деление очень условное, и ряд рассмотренных нами примеров это демонстрирует.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ АМИЛОИДЫ

В клинической практике термином «амилоид» зачастую обозначают гомогенное внеклеточное отложение, которое специфически окрашивается конго красным и демонстрирует желто-зеленое свечение при двойном лучепреломлении в поляризованном свете, а также имеет характерную тонко-фибриллярную ультраструктуру [15]. Вместе с этим многие авторы не делают различий между внеклеточными и внутриклеточными агрегатами, демонстрирующими амилоидные свойства. При этом даже тельца включения, которые окрашиваются конго красным, часто тоже называют амилоидами. Примерами таких включений являются внутриядерные агрегаты при болезни Хантингтона и тельца Леви при болезни Паркинсона [24].

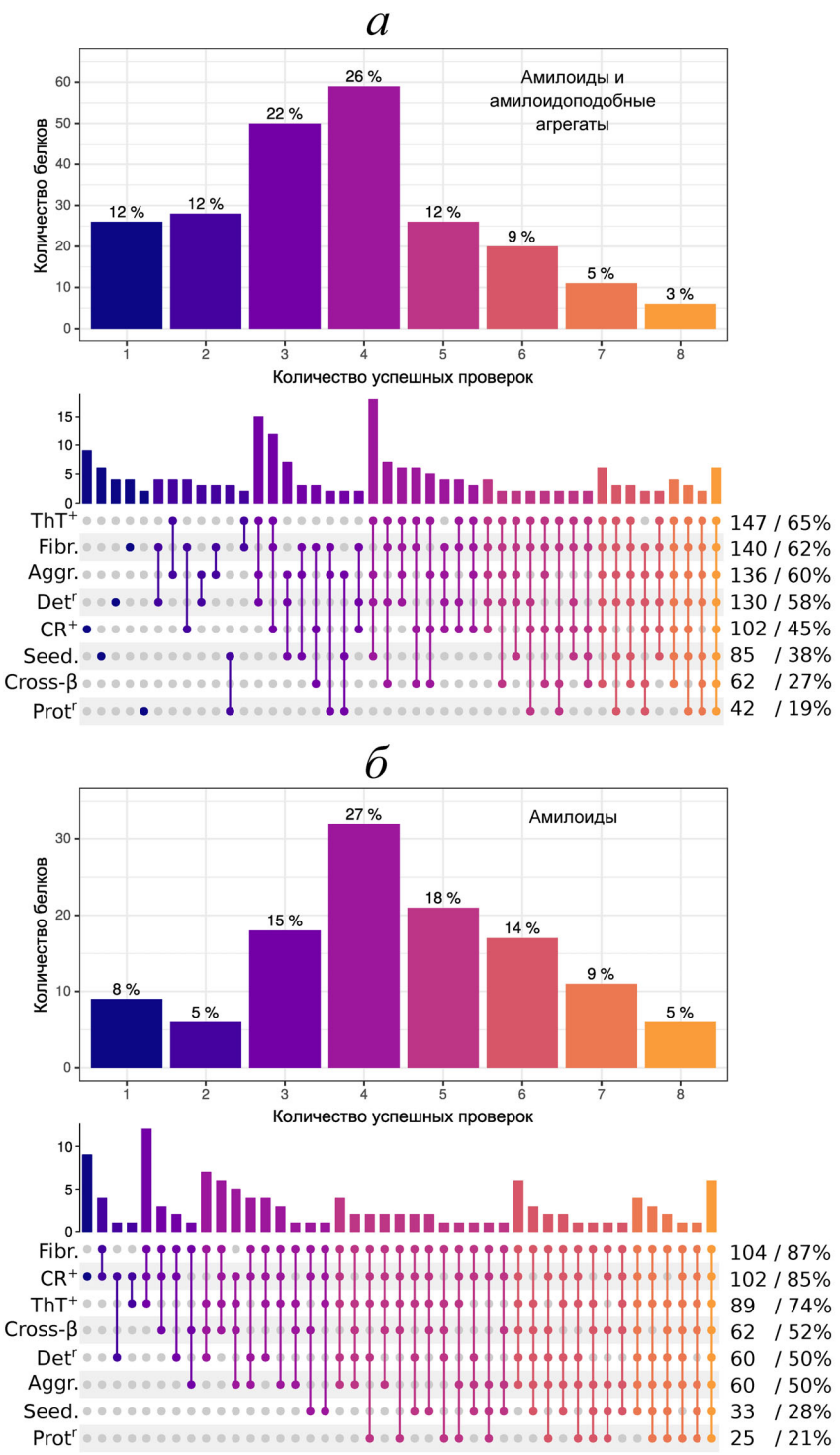


Рис. 1. Методические подходы и их сочетания в исследованиях амилоидов и амилоидоподобных агрегатов (*а*) либо только амилоидов (*б*). Учитывались только проверки, в результате которых указанные свойства были успешно продемонстрированы. Cross-β – демонстрация кросс-β структуры агрегатов (на основании данных дифракции электронов или рентгеновских лучей с двумя отражениями либо структуры агрегатов, расшифрованной методами криоэлектронной микроскопии или ядерного магнитного резонанса), CR^+ – окрашивание конго красным и двулучепреломление в поляризованном свете, ThT^+ – окрашивание тиофлавином T или его аналогами, Fibr. – фибриллярная морфология агрегатов, Seed. – способность индуцировать агрегацию, $Prot^r$ – устойчивость к действию протеаз, Det^r – устойчивость к обработке детергентами, Aggr. – свидетельство способности белка к агрегации (продемонстрированное любым способом, кроме методов, использованных для демонстрации предыдущих свойств). Эти же сокращения использованы на рис. 2–4. Ссылки на литературу представлены в таблице S в Приложении к статье. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

В настоящее время известно около 50 различных белков и пептидов, способных формировать амилоиды и амилоидоподобные агрегаты и связанных с заболеваниями человека, среди которых болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, диабет второго типа и ряд амилоидозов, возникающих в результате системного или локального отложения амилоидных фибрилл во внеклеточных пространствах тканей и органов [15, 25]. Многие из этих заболеваний являются смертельными и неизлечимыми, а риск их развития увеличивается с возрастом [26].

Амилоидогенные белки собираются в агрегаты, которые накапливаются в виде внеклеточных бляшек и внутриклеточных включений [4]. Наличие большого количества амилоидного материала может разрушать структуру ткани и механически влиять на функции пораженных органов [27]. Тем не менее есть предположение, что при амилоидных заболеваниях токсичны олигомеры и нефибриллярные амилоидные отложения [28]. В качестве примеров можно привести тетрамеры транстиретина (TTR) [29], амилоид β (Aβ) [30], легкие цепи иммуноглобулина (Ig-LC) [31] и PrP [32], которые токсичны как в клеточных культурах, так и в живых организмах. В результате конформационных изменений префибриллярные агрегаты несут на своей поверхности группы, которые обычно находятся внутри свернутых белков или рассредоточены в нативно неструктурированных белках. Это рассматривают как потенциальный фактор токсичности амилоидов [28], и исследования *in vitro* подтверждают эту гипотезу [33]. Внутриклеточные амилоидные включения могут влиять на клеточную физиологию, например, препятствуя транспорту белков и РНК и нарушая функции протеасом [4].

Как правило, существуют различия в патогенезе между локализованными и системными амилоидозами: амилоидогенный белок в первом случае синтезируется близко к месту отложения, в то время как во втором – белок синтезируется в одном или нескольких органах, а затем транспортируется в растворимой форме плазмой крови к месту, где образуются амилоидные фибриллы [28]. Отдельно можно выделить обширную группу нейродегенеративных заболеваний, которые связаны с образованием амилоидных и амилоидоподобных агрегатов. На рис. 2 представлен список белков, рассмотренных в этом подразделе, а также информация о свойствах их агрегатов.

СИСТЕМНЫЕ АМИЛОИДОЗЫ

Амилоидоз легкой цепи иммуноглобулина (AL-амилоидоз от Amyloid Light chain) является наиболее распространенной формой системного амилоидоза, на долю которого приходится около 70% всех случаев [34]. Это заболевание обычно встречается у людей с моноклональной гаммапатией – расстройством, которое характеризуется пролиферацией клонов плазматических клеток. Повышенная продукция Ig-LC приводит к образованию амилоидов и повреждению органов [35]. Меньше известно о более редком амилоидозе легкой и тяжелой (Ig-HC) цепей и амилоидозе тяжелой цепи (AHL- и AH-амилоидозы соответственно) [36], которые по клиническим симптомам сходны с AL-амилоидозом. Стоит отметить, что для упомянутых выше заболеваний существуют и локализованные формы.

Транстиретиновый амилоидоз является наиболее распространенным наследственным амилоидозом, который вызван мутациями, дестабилизирующими тетрамер транстиретина, отвечающий за транспорт гормона тироксина и витамина А [37]. К транстиретиновому амилоидозу также относят старческий системный амилоидоз – приобретенное расстройство, вызванное отложениями TTR дикого типа, проявляющееся в основном у мужчин старше 60 лет [37]. Еще одним распространенным системным амилоидозом является реактивный, или AA-амилоидоз – заболевание, связанное с устойчивыми высокими концентрациями сывороточного амилоида А (SAA) в плазме или специфических тканях при воспалительных процессах, приводящих к внеклеточным отложениям белка [38]. У пациентов с почечной недостаточностью или находящихся на диализе наличие амилоидных депозитов обусловлено повышением уровня циркулирующего в крови β2-микроглобулина (β2M) [39]. Диализный амилоидоз вызван отложениями полноразмерного β2M преимущественно дикого типа. Существует и наследственная форма заболевания, возникающая при мутациях в гене, кодирующем β2M, в результате чего синтезируется белок с повышенной склонностью к агрегации [39].

Обширную группу системных амилоидозов составляют расстройства, связанные с отложениями аполипопротеинов. Например, амилоидоз, ассоциированный с аполипопротеином A-I (ApoA-I), может быть представлен как в ненаследственной форме с отложениями белка дикого типа в атеросклеротических бляшках, так и в виде наследственной формы с отложениями мутантных форм белка [40]. Системные наследственные амилоидозы в редких случаях могут быть обусловлены мутантными формами гельзолина, α-цепи фибриногена (FGA), цистатина С (CST3) и лизоцима [15, 25, 28]. При преэклампсии отмечают агрегацию и наличие токсичных

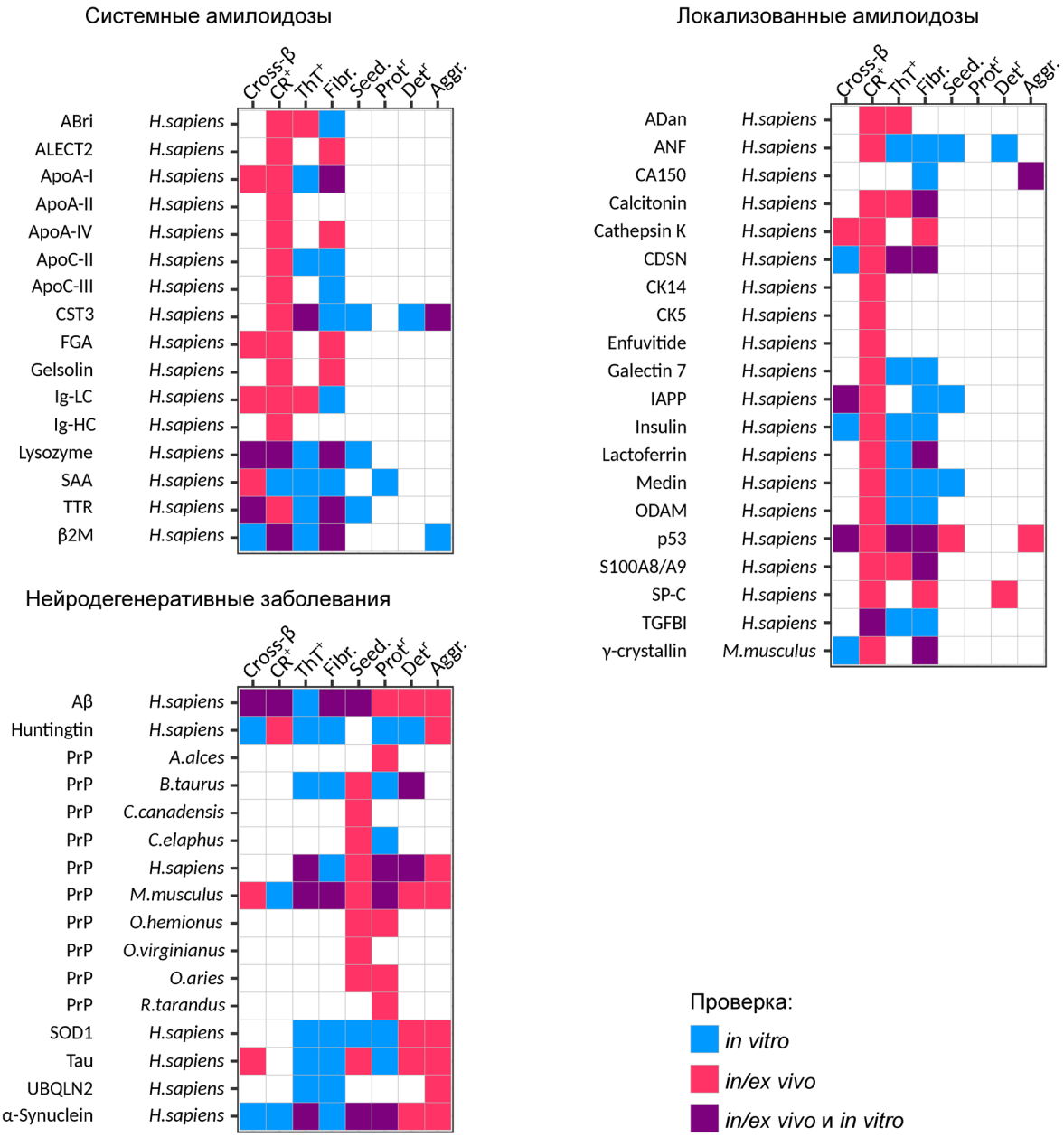


Рис. 2. Свойства патологических амилоидов и амилоидоподобных агрегатов. Обозначения аналогичны рис. 1. Ссылки на литературу представлены в таблице S в Приложении

отложений неправильно свернутых Aβ, Ig-LC, TTR, α-1-антитрипсина, альбумина и церулоплазмина в плаценте и физиологических жидкостях, однако неизвестно, какой белок играет ключевую роль в развитии этого заболевания [41]. Семейная британская деменция является аутосомно-доминантным заболеванием, характеризующимся отложениями амилоида ABri [42], основным компонентом которого является пептид, кодируемый геном *BRI2* (также известный как *ITM2B*). Мутация в гене *BRI2* приводит к замене стоп-кодона на аргинин и вследствие этого к удлинению белка [43]. Амилоидный пептид ABri включает 34 *C*-концевые аминокислоты мутантного предшественника белка и индуцирует апоптотическую гибель клеток, в то время как белок дикого типа не токсичен для клеток [44]. Интересно отметить, что другая мутация в этом гене (дупликация 10-ти нуклеотидов непосредственно перед стоп-кодоном) приводит к образованию амилоидного пептида ADan [45]. Накопление и отложение пептида ADan связано уже не с системным, а с локализованным амилоидозом – семейной датской деменцией [46].

ЛОКАЛЬНЫЕ АМИЛОИДОЗЫ

В этом разделе мы рассмотрим примеры локализованных амилоидозов, которые не затрагивают центральную нервную систему (ЦНС). Среди них наиболее распространенным примером является амилоидоз аорты, связанный с агрегацией медина, продукта расщепления гликопротеина лактадгерина [47]. Локализованные амилоидные и амилоидоподобные агрегаты обнаруживают также в опухолевых тканях. Медуллярная карцинома щитовидной железы обусловлена трансформацией парафолликулярных С-клеток и увеличением уровня кальцитонина, гормона щитовидной железы, что приводит к образованию амилоидных отложений этого белка [48]. В опухолях также идентифицируют нефункциональные амилоидоподобные олигомеры p53 [49], сферические депозиты пролактина [50] и отложения одонтогенного амелобласт-ассоциированного белка (ODAM) [15]. Еще одним гормоном, агрегация которого приводит к патологии, является островковый амилоидный полипептид (IAPP) или амилин, который был так назван в честь его склонности к образованию нерастворимых амилоидных фибрилл, что является особенностью островков Лангерганса у большинства людей с диабетом второго типа [51]. Примером возрастного заболевания является изолированный амилоидоз предсердия, обусловленный наличием амилоидных фибрилл, основным компонентом которых служит предсердный натрийуретический фактор (ANF) [52]. При старческом локализованном амилоидозе может происходить агрегация семеногелина 1 (SEMG1) в эпителиальных клетках семенных пузырьков [53]. У мужчин среднего и старшего возраста в предстательной железе обнаруживают амилоидные тельца, компонентами которых являются гетеродимеры белков S100A8 и S100A9 (S100A8/A9) [54]. К заболеваниям кожи приводят амилоидные отложения корнеодесмосина (CDSN) [55], галектина-7 [56] и кератинов (CK5, CK14) [57]. Мутации в гене *TGFBI*, кодирующем кератоэпителин (TGFBI), белок внеклеточного матрикса, связывают с различными формами дистрофии роговицы [58]. Другим белком, агрегация которого приводит к такой же патологии, является лактоферрин – железосвязывающий гликопротеин [59]. Инсулин может образовывать амилоидные фибриллы в месте инъекций лекарств у пациентов с диабетом, вызывая инъекционный амилоидоз. При этой патологии фибриллы инсулина образуют твердую подкожную массу в месте инъекции [60]. К похожему эффекту могут приводить инъекции энфувиртида – синтетического пептида, который блокирует слияние ВИЧ-1 с клеткой-хозяином [61].

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Амилоидозы, затрагивающие ЦНС, мы вынесли в отдельную группу, поскольку они изучены наиболее подробно. Пептид Aβ, фрагмент белка-предшественника β-амилоида (APP), был впервые выделен в качестве основного компонента амилоидных отложений у пациентов с болезнью Альцгеймера. Хотя функция самого APP до конца не изучена, его процессинг детально исследован, за него отвечают β- и γ-секретазы. Расщепление γ-секретазой является неточным, что приводит к образованию пептидов длиной 36–43 аминокислот, включая амилоидогенные Aβ40, Aβ42 и Aβ43 [51, 62]. Самую многочисленную фракцию (~80–90%) представляет вариант Aβ40, а вторую по численности – вариант Aβ42 (около 5–10% всех вариантов). Aβ42 является наиболее гидрофобным и более склонен к агрегации [63]. При этом пептиды Aβ проявляют различную токсичность. Так, вариант Aβ43 оказывается самым цитотоксичным, в то время как Aβ40 проявляет меньший токсический эффект [51]. Примечательно, что Aβ40 и Aβ42 способны образовывать полиморфные фибриллы, от структуры которых может зависеть скорость прогрессирования болезни Альцгеймера [64]. С этим заболеванием также связаны амилоиды, которые формирует Tau – нейрон-специфический белок [65]. В головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера Tau отделяется от микротрубочек, с которыми ассоциирован в норме, теряет способность их стабилизировать и образует нейрофибриллярные клубки [66]. Белок α-синуклеин формирует внутриклеточные амилоидные агрегаты, обнаруживаемые в тельцах Леви при болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви, в глиальных цитоплазматических включениях у пациентов с множественной системной атрофией и в аксональных сфероидах при нейроаксональных дистрофиях [51, 67]. Включения α-синуклеина также выявляют у пациентов с болезнью Альцгеймера [68].

Способность амилоида индуцировать собственную сборку, передаваться от клетки к клетке или даже от организма к организму, вызывая распространение болезни, является характерной чертой прионных заболеваний. У человека они связаны с накоплением в ткани прионной изоформы (PrP^{Sc}) клеточного прионного белка PrP^{C}. К этим заболеваниям относят болезнь Крейтцфельдта–Якоба, куру, фатальную

семейную бессонницу и синдром Герстмана–Штраусслера–Шейнкера (наследственный вариант болезни Крейтцфельдта–Якоба) [4]. Наследственные прионные заболевания вызваны мутациями в гене прионного белка (*PRNP*). В частности, известно более 60 мутаций, которые связаны с разнообразными клиническими синдромами [69]. У животных к прионным инфекциям относят скрепи овец, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, а также хроническую изнуряющую болезнь оленей и лосей [4].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием. Известно более 180 мутаций в гене, кодирующем цитоплазматическую супероксиддисмутазу (*SOD1*) [70], которые обусловливают около 20% наследственных случаев БАС [51]. Токсичность мутантных форм SOD1 при БАС объясняют неправильным сворачиванием и склонностью к агрегации. Стоит отметить, что при некоторых случаях БАС также регистрируют присутствие цитоплазматических агрегатов белков TDP-43 и FUS [51].

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АМИЛОИДЫ

В этом разделе мы собрали информацию об агрегатах, которые демонстрируют амилоидные свойства и формирование которых тесно связано с выполнением той или иной функции. К сожалению, не для всех рассмотренных примеров нам удалось найти строгие доказательства функциональности агрегатов, которые недавно были предложены [16]. Тем не менее мы оставили в этом разделе белки, для которых в литературе доминирует гипотеза о биологической значимости их агрегации. Информация о свойствах функциональных амилоидов и амилоидоподобных агрегатов собрана на рис. 3.

АМИЛОИДЫ В СОСТАВЕ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ И ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ

Ряд белков, которые входят в состав клеточной стенки либо ассоциированы с ней, формируют амилоидные и амилоидоподобные агрегаты. Эти белки способствуют поддержанию структуры и целостности клеточной стенки или иных структур оболочки клетки, а также участвуют в адгезии клеток друг к другу или к субстрату.

Большое количество амилоидов и амилоидоподобных агрегатов образуют белки, которые входят в состав клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Одним из первых таких белков стала глюкантрансфераза Bgl2. Для этого белка было показано формирование амилоидных фибрилл *in vitro* [16]. В дальнейшем было обнаружено, что фибриллы также формируют и белки клеточной адгезии, Flo1 и Muc1. Некоторые амилоидные свойства этих белков также были продемонстрированы в системе *in vivo*. Протеомный скрининг на основе масс-спектрометрии (PSIA-LC-MALDI), направленный на поиск потенциально амилоидогенных белков, позволил обнаружить и другие белки, формирующие детергент-устойчивые агрегаты в клеточной стенке: Gas1, Gas3, Gas5, Toh1 и Ygp1. Однако детально были исследованы лишь три из них: Gas1, Toh1 и Ygp1. Функции белков Toh1 и Ygp1 не установлены, в то время как *GAS1* кодирует бета-1,3-глюканозилтрансферазу. Белок Toh1 связан с мембраной клетки благодаря GPI-якорю, и, предположительно, способствует стабилизации структуры клеточной стенки за счет образования фибрилл [16]. Наконец, амилоидоподобные агрегаты белков клеточной стенки могут участвовать в адгезии клеток друг к другу.

Другой пример функциональных амилоидов, локализованных в клеточной стенке, связан с образованием воздушных гиф клетками бактерий *Streptomyces coelicolor*. Восемь белков, которые были первыми идентифицированы в составе этих структур (ChpA-H), получили общее название чаплины (chaplins) [71]. Для белков ChpD-H доказан ряд амилоидных свойств *in vivo*, однако эти результаты были получены на смесях белков из детергент-устойчивых фракций. В формировании воздушных гиф *S. coelicolor* также участвуют белки RdlA и RdlB, которые образуют дополнительный белковый слой поверх чаплинов [71]. Несмотря на высокое сходство последовательностей двух этих белков (>90%), только RdlB может образовывать фибриллы *in vitro* [71].

Амилоидные агрегаты в воздушных гифах также придают их поверхности гидрофобные свойства. Аналогичную функцию выполняют некоторые белки грибов, которые получили общее название гидрофобины (hydrophobins). Среди них белки EAS (у *Neurospora crassa*) и SC3 (у *Schizophyllum commune*) являются наиболее известными примерами амилоидов [16, 19]. Аналогичные белки (RodA, MPG1, NC2, DewA, Rep1) из разных видов грибов обладают следующими свойствами: показано их участие в формировании фибриллярных структур на поверхности клеток, высокая устойчивость к детергентам, а также взаимодействие с тиофлавином T [72–75]. Среди эукариот подобные примеры найдены

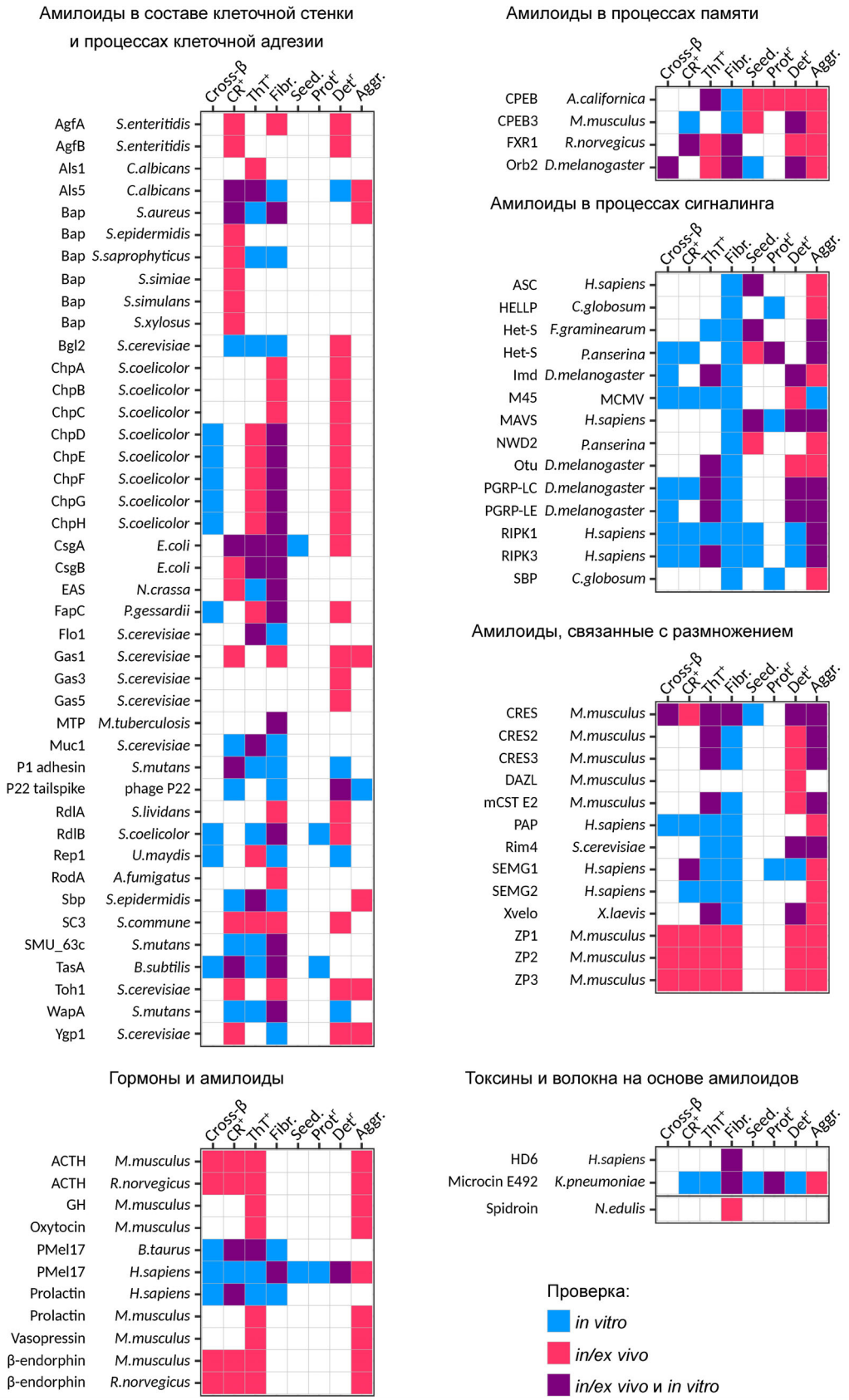


Рис. 3. Свойства функциональных амилоидов и амилоидоподобных агрегатов. Обозначения аналогичны рис. 1. Ссылки на литературу представлены в таблице S в Приложении

также у *Candida albicans* (Als1, Als5, Eap1) [76, 77].

На сегодняшний день известен целый ряд белков бактерий, агрегация которых связана с формированием биопленок и адгезией к субстрату. Наиболее известный пример – это белок CsgA *Escherichia coli*, а также его многочисленные ортологи [78], которые необходимы для образования фибрилл, названных керли (curli), на поверхности клеток и формирования внеклеточного матрикса в бактериальных биопленках [19, 79]. Аналогичная функция была предложена и для других белков. В частности, белки TasA у *Bacillus subtilis*, Bap у *Staphylococcus aureus* и FapC у *Pseudomonas fluorescens* формируют на поверхности бактерий фибриллы, для которых показаны амилоидные свойства [19, 79, 80]. Белок MTP также образует фибриллярные агрегаты на поверхности *Mycobacterium tuberculosis* [81]. Ингибирование фибриллизации белков P1, WapA и SMU_63c бактерии *Streptococcus mutans* препятствует формированию биопленок [82]. Белки AgfA и AgfB формируют детергент-устойчивые агрегаты в клетках *Salmonella enteritidis* [83,84]. Наконец, есть предположение, что белок Sbp *Staphylococcus epidermidis* также является амилоидом, поскольку он образует фибриллы, которые окрашиваются амилоид-специфическими красителями [85].

В целом, организация клеточной стенки или взаимодействий клеток друг с другом или с внешней средой является ожидаемой нишей функциональных амилоидов. Стабильность и ригидность амилоидных фибрилл позволяет придавать дополнительную прочность клеточным покровам и межклеточным контактам.

АМИЛОИДЫ В СОСТАВЕ ВОЛОКОН

В 1968 году при использовании дифракции рентгеновских лучей для исследования шелка златоглазок рода *Chrysopa* было показано, что расстояние между β-тяжами вдоль оси фибриллы составляет ~ 4,7 Å [4], что является свойством, характерным для кросс-β структуры. Однако стоит отметить, что фиброин, выделяемый тутовым шелкопрядом *Bombyx mori*, *in vitro* формирует амилоидоподобные фибриллы с необычной структурой, в которой β-тяжи параллельны оси фибриллы [86]. Другим примером белковых волокон являются паучьи шелка или спидроины – природные полимеры, характеризующиеся исключительной прочностью и эластичностью. Для них был отмечен переход от конформации на основе α-спиралей и неупорядоченных участков к структуре, обогащенной β-листами, что сходно с образованием амилоидных фибрилл. Фибриллы спидроина были обнаружены с помощью электронной микроскопии у *Nephila edulis* [16]. Миниспидроин eADF-4(C16), основанный на повторяющихся регионах ADF-4 *Araneus diadematus*, образует фибриллы с кросс-β структурой [16] и способен запускать образование амилоидоподобных фибрилл *in vitro* [87]. Необходимо добавить, что REF (Hevb1) [88], один из белков латекса из гевеи бразильской (каучуковое дерево, *Hevea brasiliensis*), в физиологических условиях *in vitro* образует агрегаты, обладающие амилоидными свойствами [89].

АМИЛОИДЫ В ПРОЦЕССАХ СИГНАЛИНГА

Изменения в конформации белков лежат в основе передачи внутриклеточных сигналов. Образование амилоидов – это также изменение конформации, поэтому неудивительно, что были найдены белки, агрегация которых является неотъемлемой частью сигнальных каскадов. Хорошо изученным примером является пара белков человека RIPK1 и RIPK3, совместная агрегация которых (коагрегация) необходима для запуска некроптоза [90, 91]. Для этих белков показаны практически все амилоидные свойства *in vitro*, а также есть доказательства их агрегации *in vivo*. Участки, которые необходимы как для агрегации, так и для осуществления сигнального каскада, содержат последовательности RHIM (от Rip homotypic interaction motif) [90].

Схожие мотивы были найдены в различных белках большого числа организмов [92], в том числе в хорошо изученном амилоиде HET-s *Podospora anserina*. Агрегаты этого белка обладают инфекционными свойствами, благодаря чему приводят к появлению приона [*Het-s*]. Этот цитоплазматический фактор необходим для запуска реакции несовместимости гетерокарионов. При слиянии гиф разных организмов, один из которых несёт этот прион, а второй – нет, может происходить запрограммированная гибель клеток. Этот процесс запускается при взаимодействии амилоидных агрегатов HET-s с мономерным белком HET-S (продукты разных аллелей одного гена), которые оказались в одном гетерокарионе после слияния клеток [93]. Последующая агрегация HET-S приводит к изменению его конформации, он получает возможность встраиваться в мембрану клетки, нарушая её целостность [94].

Последующий поиск RHIM среди других белков *P. anserina* выявил нового участника это-

го сигнального каскада, NWD2, который может запускать агрегацию HET-s. Впоследствии это приводит к гибели клеток [95]. Белки HELLP, SBP и PNT1 гриба *Chaetomium globosum*, также несут RHIM и, возможно, являются функциональными аналогами системы HET-s, HET-S, NWD2 [96].

Скрытые RHIM (cRHIM, от cryptic RHIM) были обнаружены в белках *Drosophila melanogaster* PGRP-LC, PGRP-LE и Imd, которые участвуют в запуске антимикробного ответа. Была предложена модель, согласно которой агрегация этих белков является ключевым событием в передаче сигнала [97]. Поскольку RHIM найдены среди разных белков, связанных с процессами сигналинга [98], можно ожидать описания новых функциональных амилоидов.

Распознавание клеткой вирусной РНК инициирует каскад передачи сигнала, который приводит к запуску противовирусного ответа. Одним из недавно обнаруженных участников такого сигналинга стал белок MAVS. Показано, что свою функцию он выполняет в агрегированной форме. Молекула MAVS содержит *C*-терминальный трансмембранный домен, благодаря которому он связан с митохондриальной мембраной, *N*-терминальный каспазо-рекрутирующий прионогенный домен CARD, экспонированный внутрь цитозоля, а также промежуточный участок, который рекрутирует сигнальные молекулы нижележащего пути передачи сигнала. Домен CARD взаимодействует с таким же участком рецепторных белков RIG-1 и MDA5, которые распознают чужеродную РНК, запуская каскад противовирусного ответа. При этом MAVS образует комплексы, которые инициируют агрегацию других молекул MAVS [99].

Агрегаты MAVS демонстрируют ряд свойств, характерных для амилоидов, но обладают особой структурой, поэтому они не взаимодействуют с красителями конго красным и тиофлавином Т. Белок MAVS, переходя в агрегированную форму, не претерпевает конформационных переходов α-спиралей в β-листы. На основании данных криоэлектронной микроскопии были предложены две модели агрегатов этого белка. В обоих случаях филаменты MAVS состоят из отдельных субъединиц белка, уложенных друг на друга и образующих центральную пору [99].

ТОКСИНЫ И АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

Антимикробные пептиды (АМП) – это защитные пептиды, являющиеся частью врожденного иммунитета, которые обнаружены во многих организмах. Большинство АМП представляют собой катионные и амфифильные α-спиральные белковые молекулы. Основной механизм их работы – это связывание с негативно заряженной бактериальной мембраной и нарушение ее целостности [100]. Для некоторых АМП показаны амилоидные свойства, которые, предположительно, важны для их функционирования. В большинстве случаев эти свойства проанализированы только *in vitro*, поэтому многие из этих пептидов не представлены на рис. 3 (см. таблицу S в Приложении).

Склонность к агрегации была показана для цекропинов, однако пока собрано недостаточно данных в пользу образования ими амилоидов [101]. Считается, что цекропин P1 образует локальную структуру наподобие ковра на мембране патогена, приводя к деформации мембраны, а затем к разрушению, когда концентрация АМП превысит критическую [102].

LL-37 – первый открытый антимикробный катионный пептид человека [103]. При бактериальной инвазии он высвобождается протеазами из своего предшественника hCAP-18. LL-37 образует волокнистые агрегаты *in vitro*, которые окрашиваются конго красным и характеризуются яблочно-зеленым свечением при двойном лучепреломлении в кросс-поляризованном свете [103]. Фибриллы, сформированные коротким олигопептидом из последовательности LL-37, не окрашиваются тиофлавином Т и имеют нехарактерное для амилоида строение: они состоят из плотно упакованных амфипатических α-спиралей [104]. Показано, что агрегация белка LL-37 может быть напрямую связана с его цитотоксичностью [103].

Дермасептины Drs S9 и aDrs PD-3-7 были изолированы из кожи лягушек. Они образуют фибриллы, обогащенные β-слоями, для которых показан ряд амилоидных свойств [105–107], однако, как и для многих АМП, для них нет подтверждения *in vivo*. Магайнины были обнаружены в коже лягушки *Xenopus laevis* и обладают противомикробным [108, 109] и противоопухолевым действием [110, 111], а также демонстрируют амилоидные свойства. Для них впервые был предложен антимикробный механизм с образованием тороидальных пор. Магайнины связываются с мембраной и, достигнув пороговой концентрации, приводят к ее деформации и дестабилизаци. После этого пептиды встраиваются в мембрану, образуя тороидальную пору [112]. АМП человека, протегрин-1 (PG-1), формирует *in vitro* фибриллы, которые связывают тиофлавин Т. Протегрины находятся в нерастворимом состоянии в гранулах нейтрофилов и

макрофагов. Если в клетку попадает патоген, гранулы сливаются с вакуолью, высвобождая пептиды, которые образуют каналы в мембране патогена, приводя к его гибели [113]. К известным протегринам с амилоидными свойствами относят также PG-4, выделенный из лейкоцитов свиней. Было показано, что *in vitro* он образует фибриллярные агрегаты, которые окрашиваются конго красным и тиофлавином Т. Как мономеры, так и агрегаты проявляют антимикробную активность против *B. subtilis* [114]. Микроцин E492 является известным порообразующим бактериальным токсином, продуцируемым *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Показано, что он способен формировать амилоидоподобные фибриллы, богатые β-слоями *in vivo* и *in vitro* [115]. Другим примером бактериального токсина служит белок PSMα3 *S. aureus*, образующий фибриллы с кросс-α структурой, которые могут связывать тиофлавин Т. При этом есть свидетельства токсичности фибрилл по отношению к клеткам человека [23].

Клетки Панета тонкого кишечника человека продуцируют α-дефензин 6 (HD6), который обеспечивает защиту от инвазии патогенными микроорганизмами кишечника [116]. Связываясь с поверхностными белками бактерий, HD6 подвергается упорядоченной самосборке с образованием фибрилл и наносеток, которые окружают и запутывают патогены. Это создает препятствие для физического контакта бактерий с эпителиальными клетками, необходимое для прикрепления или инвазии [116].

У растений были также обнаружены амилоидоподобные АМП. Cn-AMP2, полученный из жидкого эндосперма кокосового ореха *Cocos nucifera*, образует видимые агрегаты в водном буфере, которые связывают конго красный, тиофлавин Т, а также имеют фибриллярную морфологию. Однако в настоящее время нет прямых доказательств того, что Cn-AMP2 обладает антибактериальным эффектом исключительно в агрегированной форме [117].

Важно отметить, что белки, связанные с человеческими амилоидозами, могут вести себя как токсины. Например, Aβ проявляет антимикробные свойства, которые нацелены на патогенные бактерии и грибы *in vitro* и в модельных системах: у *Caenorhabditis elegans* и мыши [118, 119]. Антимикробные свойства продемонстрированы для ряда других амилоидогенных белков. Например, в дополнение к ферментативным свойствам лизоцим проявляет себя как АМП. Его антимикробная активность связана с пермеабилизацией клеточной мембраны патогена, предположительно через образование пор [120].

АМИЛОИДЫ В ПРОЦЕССАХ ПАМЯТИ

Присутствие амилоидов в ЦНС десятилетиями ассоциировалось исключительно с патологиями. Но всё изменилось, когда были обнаружены функциональные амилоиды белка CPEB у моллюска *Aplysia californica* и его гомологов: Orb2 у *D. melanogaster* и CPEB3 у мыши. Белки CPEB являются РНК-связывающими, причём они лучше связывают РНК, находясь в олигомеризованном состоянии [121]. В мозге исследованных животных олигомеризация белков CPEB происходит в ответ на нейрональную стимуляцию [122, 123]. В том случае, если эти белки не способны формировать агрегаты, это негативно сказывается на поддержании долгосрочной памяти, по крайней мере у *A. californica* и *D. melanogaster* [121, 122]. Всё это позволяет заключить, что белки CPEB действительно функциональны именно в агрегированном состоянии. Исследователи также называют эти белки функциональными прионами [123], что, вероятно, не имеет достаточных оснований, так как инфекционность *in vivo* CPEB и CPEB3 была продемонстрирована только в дрожжевой системе [123, 124]. До недавнего времени не было прямых доказательств того, что эта группа белков формирует амилоидные агрегаты непосредственно в живых организмах без искусственной сверхпродукции. Лишь недавно амилоидная природа была строго доказана для фибрилл Orb2, выделенных из голов дрозофил. При этом впервые удалось воссоздать в высоком разрешении структуру амилоидных фибрилл *ex vivo* с помощью криоэлектронной микроскопии [125]. Фибриллы Orb2 демонстрируют сходную с известной структурой Aβ40 трёхлучевую симметрию [125]. Таким образом, очевидно, что амилоидная структура сама по себе может и не являться причиной развития патологий ЦНС, и для понимания реальных причин развития нейродегенеративных амилоидозов необходимо глубокое изучение факторов, влияющих на амилоидогенез того или иного белка.

CPEB/Orb2 не является единственным примером амилоидов, связанных с процессами памяти. Недавно было показано, что белок FXR1, участвующий в развитии долгосрочной памяти и эмоций, присутствует в мозге крыс в составе амилоидных агрегатов. Более того, его почти невозможно было детектировать в мономерной форме. При этом обнаруженные агрегаты демонстрировали амилоидные свойства [126]. FXR1 – это РНК-связывающий белок, для которого показано, что в амилоидной форме он способен связывать мРНК, защищая её от действия РНКаз [126]. Вероятно, таким образом он влия-

ет на трансляцию определённых мРНК и, как следствие, на дифференциальную экспрессию в нейронах. Тот факт, что в мозге крысы FXR1 обнаруживается исключительно в составе детергент-устойчивых агрегатов, в совокупности с данными о том, что FXR1 важен для регуляции памяти и эмоций, позволяет причислить FXR1 к функциональным амилоидам. Амилоидогенный фрагмент FXR1 является высококонсервативным у млекопитающих [126], что позволяет экстраполировать полученные результаты на ортологи этого белка у других организмов.

Вполне вероятно, что участие амилоидов в процессах памяти не ограничивается животными и их нервной системой. Альтернативная амилоидная конформация может нести определенную информацию, которая может так или иначе быть «дешифрована» на клеточном уровне, поэтому использование подобных агрегатов для долгосрочного хранения информации может быть универсальным механизмом, который мог многократно и независимо реализовываться в эволюции. Одним из примеров похожего механизма клеточной памяти является существование так называемых «мнемонов». Это агрегаты белка Whi3 у дрожжей, которые возникают в ответ на неудачное слияние клеток противоположных типов спаривания и остаются в клетках дрожжей на всю жизнь, как память о прошедшем событии [127]. В отличие от прионов, мнемоны не передаются в дочерние клетки при делениях. Тем не менее вполне возможно, что известные прионы низших эукариот (см. далее) также могут являться единицами наследования такой «памяти», которые однако уже переносят информацию, не ограничиваясь жизнью одной клетки, на протяжении многих клеточных поколений. Учитывая, что для некоторых прионов на сегодняшний день известно, что они способны возникать в ответ на определенные стрессовые воздействия, не исключено, что прионы для одноклеточных организмов – это такая «память предков» о пережитых ими невзгодах.

АМИЛОИДЫ, СВЯЗАННЫЕ С РАЗМНОЖЕНИЕМ

Функциональные амилоидные фибриллы были обнаружены в структурах, связанных с половым размножением, например в акросоме сперматозоидов. Считается, что эти фибриллы способствуют контролируемому высвобождению белков во время акросомной реакции, ключевого события в оплодотворении ооцитов, при котором содержимое акросомы изливается наружу. Амилоиды, образованные белками подгруппы CRES (Cystatin-related epididymal spermatogenic) – CRES, CRES2, CRES3 и цистатин E2 (mCST E2), присутствуют в эпидидимисе мыши, в то время как у человека в этом же органе обнаруживают агрегаты цистатина C (CST3). Роль амилоидов, образуемых белками CRES, не совсем понятна, но существуют предположения об их функциональной значимости. Известно, что они обладает антимикробной активностью, необходимы для акросомной реакции, нормального функционирования лизосом в эпидидимисе, а также играют роль в созревании сперматозоидов. Семенная жидкость также содержит амилоиды и амилоидоподобные фибриллы, образованные фрагментами пептида фермента фосфатазы простатической кислоты (PAP) и белков семеногелина (SEMG1 и SEMG2) соответственно. Эти фибриллы, первоначально идентифицированные как усилители вирусной инфекции, связываются с поврежденными сперматозоидами и иммобилизуют их, обеспечивая их уничтожение иммунными клетками. Амилоиды, образованные белком SEMG1, также обнаружены при некоторых патологиях.

Ооциты большинства позвоночных содержат тела Бальбиани (Balbiani bodies). Матрикс этого компартмента у *X. laevis* состоит из фибриллярной сети, образованной белком Xvelo. Эти фибриллы окрашиваются тиофлавином T и устойчивы к обработке детергентами [128]. Амилоидные свойства также показаны для белков, участвующих в формировании оболочки ооцита у насекомых, рыб и млекопитающих. Данные экспериментов по рассеянию рентгеновских лучей свидетельствуют, что амилоидные структуры присутствуют в составе хориона бабочки *Antheraea polyphemus* [129]. Стоит заметить, что значительная часть амилоидных свойств была продемонстрирована для отдельных пептидов данных белков, соответствующих участку тандемных повторов (cA-пептидов) [130, 131]. Интересно, что сборка амилоидных фибрилл из таких пептидов происходит через промежуточную жидкокристаллическую фазу [132]. У костистых рыб в составе хориона присутствуют белки группы ZPB, отдельные пептиды которых также склонны к формированию амилоидных агрегатов [133]. Амилоидные свойства показаны и для белков в составе блестящей оболочки (zona pellucida) ооцита млекопитающих. Так, белки в составе этой оболочки у мышей *in vivo* демонстрируют характерную морфологию агрегатов, а также типичный для кросс-β структуры паттерн дифракции рентгеновских лучей и связывание с амилоид-специфическими красителями [134].

Эти же свойства были показаны для агрегатов пептидных аналогов фрагментов белков ZP1–ZP4 человека в системе *in vitro* [135]. Считается, что образование амилоидных фибрилл в оболочках ооцитов и эмбрионов у различных животных способствует защите от внешних воздействий, таких как повышенная температура, механическое давление и другие.

Некоторые амилоидоподобные белки действуют как регуляторы клеточного цикла и влияют на половое размножение дрожжей. Белок Rim4 *S. cerevisiae* образует детергент-устойчивые агрегаты во время фазы G1 мейоза. Это приводит к репрессии трансляции циклина Clb3 и последующему запуску деления. Разборка агрегатов Rim4 запускается путем фосфорилирования этого белка [136].

ГОРМОНЫ И АМИЛОИДЫ

С гормонами связано обнаружение первых функциональных амилоидов млекопитающих – фибрилл меланосом, сформированных белком PMel17. Оказалось, что PMel17 участвует в синтезе меланина именно в амилоидной форме [137]. PMel17 подвержен протеолитическому расщеплению в меланоцитах, на первом этапе которого образуется фрагмент Mα [138]. Амилоидные свойства надёжно показаны для целого Mα, причем его конверсия в амилоидную форму происходит по меньшей мере на четыре порядка быстрее, чем у Aβ или α-синуклеина [137, 139]. Это можно было бы объяснить тем, что, в отличие от патологических амилоидов, PMel17 подвергался эволюционному отбору в сторону повышения эффективности амилоидизации. Однако в клетках Mα подвержен дальнейшему протеолизу и не является основным компонентом агрегатов меланосом.

Существовали противоречивые данные о том, какие именно домены PMel17 непосредственно формируют амилоидные фибриллы в клетке [138–140]. Предположительно, разные продукты протеолиза PMel17 амилоидизуются на разных этапах формирования меланосом. Присутствующие в клетке фибриллы, таким образом, представляют собой сложные коагрегаты из разных фрагментов PMel17 [141]. Мономерный предшественник меланина, индол-5,6-хинон (DHQ), напоминает по структуре тиофлавин T, и предполагается, что фибриллы Pmel17 могут являться затравкой для полимеризации DHQ. О том, что амилоид может служить в качестве такого «катализатора», говорит тот факт, что не только Mα, но и фибриллы α-синуклеина или Aβ увеличивают скорость синтеза меланина в системе *in vitro* [137]. Формирование комплексных агрегатов из амилоидных фибрилл PMel17, по-видимому, обеспечивает максимальную эффективность синтеза меланина.

Кроме участия амилоидов в синтезе гормонов, было показано, что сами пептидные гормоны могут формировать амилоиды, которые, предположительно, нужны для их хранения в секреторных гранулах. Из 42-х исследованных *in vitro* пептидных гормонов 10 демонстрировали спонтанное формирование амилоидных фибрилл, а 31 гормон формировал фибриллы в присутствии гликозаминогликана гепарина [142]. Пролактин формировал их в присутствии хондроитин сульфата A – гликозаминогликана, найденного ранее в гранулах, содержащих пролактин.

Окситоцин демонстрировал глобулярную структуру, которая связывалась с тиофлавином T. Адренокортикотропный гормон (ACTH) не был способен формировать амилоиды сам по себе и делал это только в присутствии агрегатов β-эндорфина (оба являются продуктами одного прогормона и локализуются вместе в секреторных гранулах клеток гипофиза). Эти данные были получены с использованием ACTH и β-эндорфина человека, но *in vivo* были подтверждены амилоидные свойства этих белков, выделенных из секреторных гранул мыши и крысы [142].

Важное свойство, которое было обнаружено у амилоидов некоторых гормонов – способность отделять мономеры в условиях, соответствующих высвобождению пептидов из секреторных гранул. Кроме того, амилоиды только семи гормонов демонстрировали токсичность для клеток [142]. Оба этих наблюдения говорят о том, что действительно амилоиды некоторых гормонов могут выполнять запасающую функцию в клетке. Влияние амилоидов глюкагона на токсичность оказалось в два раза сильнее Aβ40 [142], что подтверждает данные о том, что амилоиды глюкагона могут быть патологическими [143]. Интересно, что ещё один гормон, пролактин, обнаружен в составе амилоидов у пациентов с аденомой [144], однако в свете данных о том, что амилоиды пролактина могут быть функциональными, неясно имеет ли место негативное влияние амилоидов пролактина при патологии. В предыдущем разделе мы также рассмотрели белок семеногелин, агрегаты которого обнаруживают как при амилоидозах, так и в нормальных сперматозоидах. Таким образом, не исключено что и амилоиды некоторых других белков, обнаруженные при различных патологиях, в действительности могут также являться и функциональными амилоидами.

АМИЛОИДЫ С НЕОДНОЗНАЧНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛЬЮ

В этом разделе мы собрали примеры белковых агрегатов, чья биологическая роль является поводом дебатов в литературе. В частности, до сих пор нет единого мнения по поводу назначения прионов дрожжей, так как есть аргументы как за, так и против их возможной функциональности [145, 146]. Белки в составе немембранных органелл также могут формировать амилоидные агрегаты, однако не всегда ясно, является ли эта особенность необходимой для функционирования этих белков. Многие белки-резиденты немембранных органелл также связаны с патогенезом таких заболеваний, как БАС и некоторые виды деменции. Наконец, агрегация показана для различных ферментов и поринов, о функциональной значимости которой есть лишь предположения. Информация о свойствах агрегатов этих белков собрана на рис. 4.

АМИЛОИДНЫЕ И АМИЛОИДОПОДОБНЫЕ ПРИОНЫ

Большое количество амилоидов, которые обладают инфекционными свойствами и называются прионами, найдено у дрожжей *S. cerevisiae*. Фенотипическое проявление большинства из них связано с формированием амилоидных агрегатов того или иного белка. В большинстве случаев это приводит к утрате или ослаблению функции соответствующего белка. В качестве примеров можно привести белки Sup35, Ure2, Swi1, Cyc8, Mot3 [93]. Из-за этого штаммы, поддерживающие определённый прион, имеют фенотип, сходный с мутантным по гену, кодирующему соответствующий белок. Но этот фенотип демонстрирует цитоплазматическое наследование, так как амилоидные агрегаты локализуются в цитоплазме [93]. Первыми описанными прионами дрожжей стали факторы [*URE3*], [*PSI*$^+$] и [*PIN*$^+$] ([*RNQ*$^+$]), которые сопряжены с появлением амилоидных агрегатов Ure2, Sup35 и Rnq1 соответственно [93]. Благодаря продолжительной истории исследований эти белки стали примерами амилоидов, для которых продемонстрированы практически все свойства. Позднее было найдено еще более десятка дрожжевых прионов (таблица).

Наличие свойств, специфичных для прионов *S. cerevisiae*, и удобных генетических тестов, позволяющих их выявить, дало возможность проводить скрининги в дрожжах, направленные на поиск белков, проявляющих прионные и амилоидные свойства. В ходе одного скрининга [11] такие свойства были показаны для десятков белков дрожжей, точнее, их потенциальных прионных доменов, выявленных *in silico*. В большинстве случаев остаётся неясным, способны ли выявленные белки формировать настоящие прионы в дрожжах. Это связано прежде всего с тем, что установленные свойства фрагмента белка не всегда можно экстраполировать на полноразмерный белок.

Отдельного упоминания заслуживает фактор [*ISP*$^+$], который, согласно генетическим данным, является прионной формой белка Sfp1 [161]. Однако его фенотип (Isp+) возникает вследствие изменения числа копий хромосомы II, которое происходит при сверхпродукции Sfp1 [162]. При этом Sfp1 может образовывать детергент-устойчивые агрегаты, которые, по-видимому, никак не связаны с Isp+ [163].

История Isp+ наглядно демонстрирует, что выводы об амилоидной природе определённого приона, основанные на генетическом анализе, но не подкреплённые существенными биохимическими или структурными данными нельзя считать достаточно обоснованными. Известные на сегодняшний день наследственные факторы, демонстрирующие прионоподобное поведение, но не связанные с амилоидами, такие как [*GAR*$^+$] [164] и [*SMAUG*$^+$] [165] и другие [166], также подтверждают это. Кроме того, белки, для которых свойственно образование жидких капель (см. далее), часто способны формировать и амилоиды, как, например Sup35 [167]. Наличие таких примеров позволяет сделать вывод о том, что сочетание генетических данных *in vivo* с доказательством амилоидогенности белка *in vitro* также является недостаточным для того, чтобы утверждать, что определённый белок способен принимать амилоидную конформацию в живых организмах. Для справедливости такого утверждения необходимы дополнительные доказательства амилоидных свойств *in vivo*, которые на сегодняшний день отсутствуют у большинства «классических» амилоидных прионов дрожжей.

НЕМЕМБРАННЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ И БЕЛКОВЫЕ АГРЕГАТЫ

Немембранные органеллы – это динамические структуры в ядре или цитоплазме клетки, образованные большим скоплением взаимодействующих биологических молекул, выполняющих специфический набор функций. Описано множество типов таких компартментов с разнообразными клеточными функциями [168]. К ядерным немембранным органеллам относят ядрышко, тельца Кахаля, ядерные спеклы или

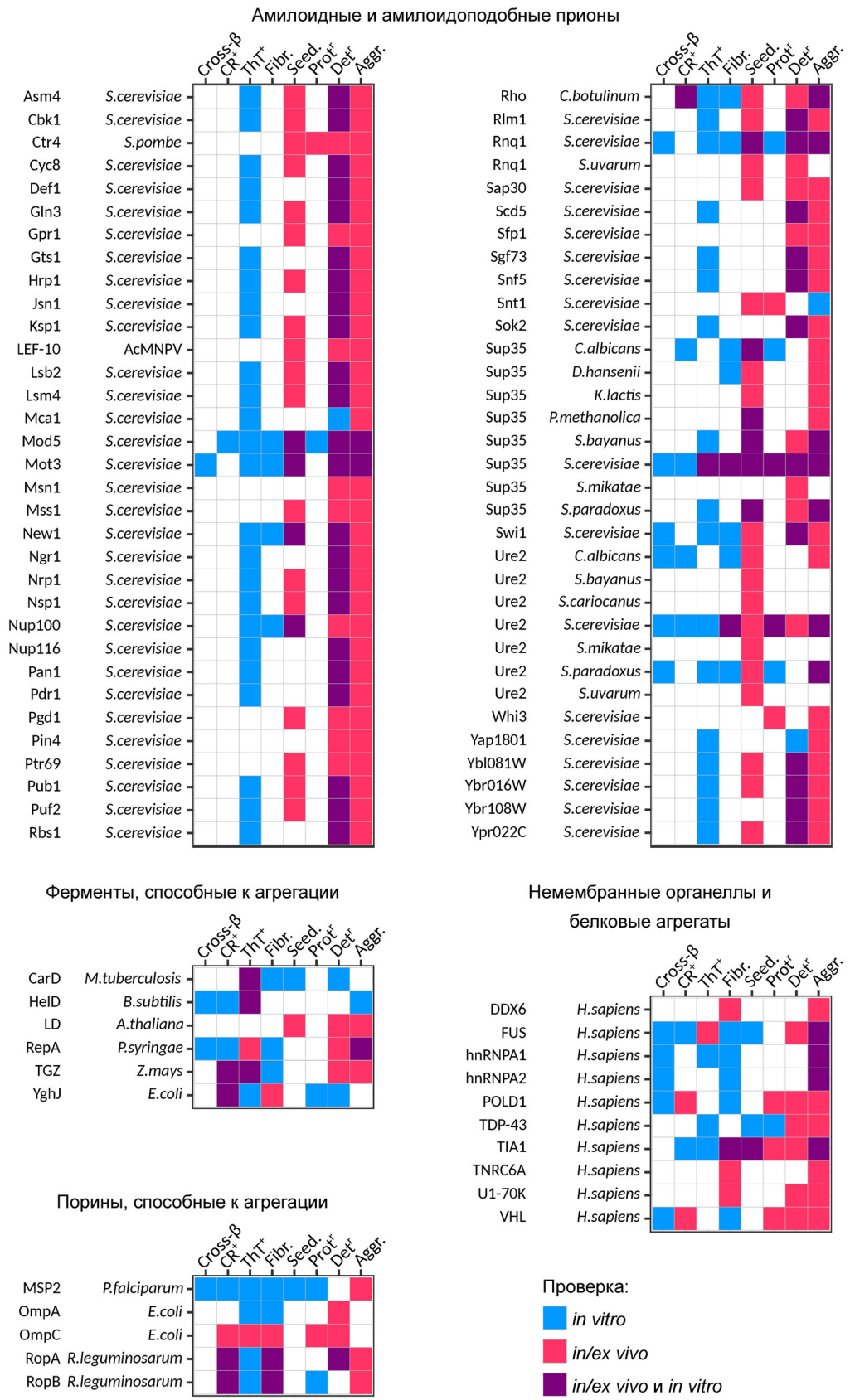


Рис. 4. Свойства амилоидов и амилоидоподобных агрегатов с неоднозначной биологической ролью. Обозначения аналогичны рис. 1. Ссылки на литературу представлены в таблице S в Приложении

Дрожжевые прионы, связанные с появлением амилоидных или амилоидоподобных агрегатов

Прион	Структурный белок и его функция	Фенотип приона	Ссылки
[*URE3*]	Ure2, негативный регулятор генов катаболизма бедных источников азота	ассимиляция клетками бедных источников азота в присутствии богатых	[9]
[*PSI*$^+$]	Sup35, фактор терминации трансляции eRF3	снижение эффективности терминации трансляции (нонсенс-супрессия)	[9, 147, 148]
[*PIN*$^+$] ([*RNQ*$^+$])	Rnq1, функция белка неизвестна	инициация формирования других прионов	[149, 150]
[*SWI*$^+$]	Swi1, компонент хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF	неспособность использовать неферментируемые источники углерода, ухудшение флоккуляции и псевдогифального роста; при наличии приона [*PIN*$^+$], усиление нонсенс-супрессии (фактор [*NSI*$^+$])	[151–153]
[*MOD*$^+$]	Mod5, фермент изопентинилтрансфераза, который модифицирует тРНК	устойчивость к ингибиторам эргостерола (например, флуконазол)	[154]
[*OCT*$^+$]	Cyc8, репрессор транскрипции (совместно с Tup1)	неспособность ассимилировать лактат, нарушение скрещивания и споруляция	[155]
[*MOT3*$^+$]	Mot3, транскрипционный фактор, регулирует гены анаэробного метаболизма и гены, участвующие в биосинтезе клеточной стенки и эргостерола	факультативная многоклеточность, формирование биопленок	[11, 156]
[*NUP100*$^+$]	Nup100, компонент комплекса ядерной поры	незначительное ускорение импорта в ядро	[157]
[*LSB2*]	Lsb2 (Pin3), негативный регулятор фактора сборки актиновых филаментов	депонирование других белков в составе агрегатов, повышение частоты возникновения [*PSI*$^+$]	[158, 159]
[*GLN3*$^{\uparrow +}$]	Gln3 (только при сверхпродукции), регулятор генов катаболизма бедных источников азота	снижение токсичности сверхэкспрессии *GLN3*, устойчивость к рапамицину	[160]

тельца гистонового локуса. Эти органеллы играют важную роль в процессах транскрипции, созревания различных видов РНК, а также биогенезе рибосом [169]. В свою очередь, цитоплазматические немембранные органеллы зачастую связаны с процессингом, хранением и деградацией белков и мРНК. К ним относят такие структуры, как Р-тельца и стресс-гранулы [168], а также недавно обнаруженные А-тельца [170].

Многие немембранные органеллы обладают жидкостными свойствами и формируются за счет процесса фазового перехода жидкость-жидкость (liquid-liquid phase separation), происходящего при взаимодействии белковых молекул и приводящего к формированию структур типа жидкая капля (liquid droplet). Большое количество белков немембранных органелл взаимодействуют с РНК и несут в своей структуре мотивы распознавания РНК. Важную роль в формировании немембранных органелл играют внутренне неупорядоченные (intrinsically disordered) участки, которые предопределяют способность этих белков вступать в поливалентные межмолекулярные взаимодействия, приводящие к фазовым переходам [171–176]. Такие фрагменты зачастую обладают специфическим аминокислотным составом с низким разнообразием, и поэтому их называют LC-доменами (от low complexity). Участки, ответственные за фазовое разделение, также часто имеют аминокислотный состав, характерный для прионных доменов, вследствие чего обозначаются как прионоподобные [168].

Считается, что в норме немембранные органеллы на начальных стадиях своего формирования не содержат агрегатов с классической амилоидной структурой. При созревании же таких органелл в их составе могут появляться сначала лабильные амилоидоподобные агрегаты, а затем и стабильные амилоидные фибриллы [177–179]. В то же время формирование амилоидных фибрилл некоторых компонентов немембранных органелл связано с развитием таких смертельных нейродегенеративных заболеваний челове-

ка, как БАС и лобно-височная деменция. Остается неясным, является ли формирование амилоидных фибрилл необходимым или побочным свойством рассматриваемых белков. Кроме того, структура агрегатов, формируемых многими белками-резидентами немембранных органелл, имеет ряд важных отличий от типичной структуры амилоидных фибрилл (в частности, агрегаты ряда таких белков чувствительны к воздействию высокой температуры и детергентов [180, 181]).

РНК-связывающий белок FUS, участвующий в формировании Р-телец, способен к агрегации и активно взаимодействует с агрегатами других белков [182], а его мутантные формы связаны с БАС. За формирование агрегатов FUS отвечает его LC-домен. Данный фрагмент целиком, как и отдельные его участки, названные RAC (от Reversible Amyloid Core), способен *in vitro* формировать неразветвленные амилоидные фибриллы, связывающие амилоид-специфические красители и обладающие характерной структурой [183,184]. В то же время структура этих фибрилл имеет ряд характерных отличий от традиционной кросс-β модели: так, агрегаты FUS-LC характеризуются единообразием структуры и отсутствием регулярных взаимодействий между не входящими в состав амилоидного кора участками [183]. RAC1-фрагмент FUS при этом формирует структуру на основе упорядоченных петель; фибриллы, сформированные RAC2, имеют обводненную поверхность взаимодействия β-листов [184]. Предполагается, что эти свойства способствуют обратимому формированию амилоидных агрегатов (показано, что агрегаты FUS-LC не устойчивы к воздействию SDS, но устойчивы к иным детергентам [180, 185]).

Белки hnRNPA1 и hnRNPA2B1 являются ядерными рибонуклеопротеинами, играющими большую роль в процессинге гетероядерной РНК и регуляции экспрессии генов [186]. Их амилоидные свойства были обнаружены при исследовании влияния мутаций в кодирующих эти белки генах на семейные формы БАС. Как белки дикого типа, так и их мутантные формы способны формировать фибриллы *in vitro*, причем БАС-ассоциированные мутации в прионоподобных доменах hnRNPA1 и hnRNPA2B1 ускоряют агрегацию этих белков [187]. Отдельные участки hnRNPA1 (LC домен и RAC1/2) обратимо формируют амилоидные фибриллы при температурных воздействиях *in vitro*. За их образование так же, как и в случае FUS, отвечают RAC-элементы, которые способны формировать амилоидные фибриллы самостоятельно. Однако их структура несколько отличается от типичной кросс-β структуры. В середине амилоидного кора имеется остаток аспарагиновой кислоты, который отвечает за дестабилизацию структуры. Его мутации в RAC-элементах препятствуют переходу белка из фибриллярного состояния в растворимое [181].

Агрегаты белка TDP-43 были обнаружены в составе включений в мозге пациентов с БАС и лобно-височной лобарной дегенерацией (ЛВЛД). Несмотря на то что существует предположение об их прионоподобных свойствах, белок TDP-43 не способен формировать протяженные амилоидные фибриллы, образуя лишь небольшие олигомеры. Они способны индуцировать агрегацию не только нормального TDP-43, но и других амилоидогенных белков, таких как Aβ [188]. В норме TDP-43 является РНК-связывающим белком-регулятором сплайсинга мРНК; при стрессовых воздействиях TDP-43 входит в состав стресс-гранул. Интересно, что возможна также олигомеризация TDP-43 за счет взаимодействия мономеров через их *N*-концевые участки, что препятствует взаимодействию LC-доменов и патологической агрегации. Более того, такая олигомеризация важна для выполнения биологической функции TDP-43 [188]. Таким образом, агрегация TDP-43 может происходить двумя способами, но неясно является ли каждый из них функционально важным и то как они связаны с патологическими процессами при БАС и ЛВЛД.

Еще одним важным примером обратимой агрегации являются А-тельца, формируемые в клетках при стрессовых воздействиях [170]. А-тельца, в отличие от рассмотренных ранее немембранных органелл, являются своеобразным хранилищем амилоидных агрегатов, которые образуются в ходе ответа клетки на стрессовые воздействия (такие как закисление цитоплазмы и тепловой шок). Эти белковые скопления окрашиваются конго красным *in vivo*, устойчивы к обработке протеазами и содержат фибриллярные агрегаты, которые взаимодействуют с амилоид-специфическими антителами. При помощи методов протеомного анализа было продемонстрировано, что в состав А-телец входит большое количество различных белков, в частности белки VHL и POLD1. В составе этих белков идентифицированы особые участки, названные амилоид-конвертирующими мотивами, которые способствуют привлечению белков в А-тельца за счет взаимодействия с рибосомной межгенной некодирующей РНК. В системе *in vitro* данные участки формируют типичные амилоидные фибриллы с характерной структурой. В то же время способность образовывать полноценные амилоидные фибриллы для полноразмерных VHL и POLD1 не показана, и структур-

ные особенности их белковых агрегатов в А-тельцах остаются неизученными [170].

Недавно было показано, что белок Tau, рассмотренный нами ранее, способен претерпевать фазовое разделение и входить в состав немембранных органелл в нейронах. Неясно является ли нахождение Tau в составе немембранных органелл функционально важным, но показано, что фазовое разделение может способствовать формированию агрегатов Tau *in vivo* и *in vitro* [189].

ПОРИНЫ И ФЕРМЕНТЫ, СПОСОБНЫЕ К АГРЕГАЦИИ

Различные белки-порины могут формировать амилоидные и амилоидоподобные агрегаты. Среди известных примеров большинство – это белки прокариот (RopA, RopB, OmpA, OmpC) [190–193] и один белок эукариот (MSP2) [19]. Насколько процесс агрегации поринов является патологическим или функциональным сказать сложно. Тем не менее есть вероятность, что он может быть очень распространенным. На основании биоинформатического анализа было высказано предположение, что фрагменты поринов, которые образуют внутреннюю часть поры, способны формировать амилоидные структуры [194].

Кроме поринов известен ряд ферментов, способных к агрегации. Три белка, которые попали в наш анализ, так или иначе физически взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, это белки CarD, HelD и RepA [195–200]. Кроме этого, способность к агрегации была показана для протеазы YghJ [201] и трансглутаминазы TGZ [202].

КРИЗИС ТЕРМИНА «АМИЛОИД»

Наиболее универсальным определением термина «амилоид» считается следующее: амилоиды – это фибриллярные белковые агрегаты, имеющие кросс-β структуру [4, 14, 17, 51] с уточнением, что наличие яблочно-зеленого свечения при двулучепреломлении после окрашивания конго красным является доказательством кросс-β структуры [15, 16]. При этом более строгое определение включает также требование демонстрации этих свойств *in vivo* для нативных белков при естественном уровне продукции. В обзоре мы не руководствовались этим уточнением. При сборе и анализе данных о свойствах различных белков мы не обнаружили принципиальных противоречий с указанным определением термина, хотя авторы не всегда его придерживаются, что было отмечено и ранее [17].

Тем не менее стоит обратить внимание на примеры белковых агрегатов с кросс-β структурой, которые термолабильны и не устойчивы к детергентам. Эта структура показана *in vitro* для пептидов FUS, его LC домена, а также LC фрагмента hnRNPA2. Авторы называют такие агрегаты амилоидоподобными, но не амилоидными [180]. Аналогичные результаты были получены и для полноразмерного белка hnRNPA1 [181]. Таким образом, нам кажется актуальным вопрос: «стоит ли называть эти агрегаты амилоидами, поскольку они обладают кросс-β структурой?».

В случае положительного ответа, возможно, придется признать, что амилоидные агрегаты не обязательно должны быть стабильными. Такой подход, предположительно, приведет к увеличению количества амилоидов. В случае с FUS было показано, что за формирование агрегатов отвечает короткий фрагмент LC-домена, названный LARKS. Аналогичные мотивы белков NUP98 и hnRNPA1 также формируют термолабильные фибриллы с кросс-β структурой. Биоинформатический поиск выявил массу сходных последовательностей среди белков, входящих в состав различных комплексов, образующихся по принципу разделения фаз [203]. Однако это только предположение, наличие сходных последовательностей не может гарантировать таких же свойств у полноразмерных белков. Кроме этого, сохранение исходного определения, основанного только на структуре агрегатов (без уточнения сведений об их стабильности), подчеркивает ограничение существующих методов поиска новых кандидатов в амилоиды, которые основаны только на их устойчивости к детергентам [204, 205] (эти подходы не могут выявлять нестабильные агрегаты с кросс-β структурой). Вне зависимости от выбранного пути, к сожалению, остается проблема с описанием массы амилоидоподобных агрегатов, которые очень разнообразны с точки зрения структуры. Если критерий структуры является ключевым для выделения амилоидов в отдельную группу, то амилоидоподобные агрегаты также необходимо классифицировать аналогичным образом. В нашем обзоре мы рассмотрели примеры агрегатов MAVS, PSMα3, SOD1 и LL-37, которые обладают частью амилоидных свойств, но обладают самыми разными вариантами структуры, например β-штопор или кросс-α [4]. Сейчас они попадают в единую группу амилоидоподобных агрегатов, хотя если критерий структуры является основополагающим, такие агрегаты должны быть классифицированы отдельно друг от друга.

Стоит также отметить, что некоторые критерии, которые используют для доказательства амилоидных свойств, являются искусственными и в явном виде не отражают свойства, которые релевантны для биологических систем. Например, окрашивание специфическими красителями не имеет очевидного биологического смысла, поскольку эти вещества в норме отсутствуют в клетке или в организме. Также нам не известны клеточные белки или системы, которые бы умели специфически распознавать кросс-β-структуру, но не другие варианты укладки агрегатов со свойствами амилоидов. Существуют амилоид-специфические антитела, которые, возможно, способны дифференцировать разные варианты укладок [206], но этот пример сложно рассматривать как универсальный. В то же время стабильные фибриллярные агрегаты часто упоминают как один из примеров образования различных белковых комплексов на основе разделения фаз [207]. В этой связи ключевыми отличиями этих агрегатов от других являются их морфология (фибриллы) и стабильность (слабый обмен молекул между агрегатом и окружающим раствором). С биологической точки зрения эти критерии являются релевантными, поскольку отражают биофизическое состояние определенных молекул в клетке, возможность их свободного перемещения и, следовательно, участия в тех или иных процессах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50590.

Благодарности. Авторы благодарят профессора, д.б.н. А.П. Галкина (СПбГУ и ИОГен РАН) за критическое прочтение рукописи.

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. 9, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kyle, R. A. (2001) Amyloidosis: a convoluted story, *Br. J. Haematol.*, **114**, 529-538.
2. Tanskanen, M. (2013) “Amyloid” – historical aspects, in *Amyloidosis* (Feng, D., ed.), IntechOpen, pp. 3-24. 3. Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., and Bobylev, A. G. (2019) Congo red and amyloids: history and relationship, *Biosci. Rep.*, **39**, BSR20181415.
4. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., and Radford, S. E. (2018) A new era for understanding amyloid structures and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 755-773.
5. Kushnirov, V. V., Dergalev, A. A., and Alexandrov, A. I. (2020) Proteinase K resistant cores of prions and amyloids, *Prion*, **14**, 11-19.
6. Kushnirov, V. V., Alexandrov, I. M., Mitkevich, O. V., Shkundina, I. S., and Ter-Avanesyan, M. D. (2006) Purification and analysis of prion and amyloid aggregates, *Methods*, **39**, 50-55.
7. Dear, A. J., Michaels, T. C. T., Meisl, G., Klenerman, D., Wu, S., Perrett, S., Linse, S., Dobson, C. M., and Knowles, T. P. J. (2020) Kinetic diversity of amyloid oligomers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 12087-12094.
8. Prusiner, S. B. (1987) Prions and neurodegenerative diseases, *N. Engl. J. Med.*, **317**, 1571-1581.
9. Wickner, R. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science*, **264**, 566-569.
10. Osherovich, L. Z., and Weissman, J. S. (2001) Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [*PSI*$^+$] prion, *Cell*, **106**, 183-194.
11. Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., and Lindquist, S. (2009) A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins, *Cell*, **137**, 146-158.
12. Chandramowlishwaran, P., Sun, M., Casey, K. L., Romanyuk, A. V., Grizel, A. V., Sopova, J. V., Rubel, A. A., Nussbaum-Krammer, C., Vorberg, I. M., and Chernoff, Y. O. (2018) Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast, *J. Biol. Chem.*, **293**, 3436-3450.
13. Sivanathan, V., and Hochschild, A. (2013) A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates, *Nat. Protoc.*, **8**, 1381-1390.
14. Nizhnikov, A. A., Antonets, K. S., and Inge-Vechtomov, S. G. (2015) Amyloids: from pathogenesis to function, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1127-1144.
15. Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Eisenberg, D. S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., Sekijima, Y., Sipe, J. D., and Westermark, P. (2018) Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee, *Amyloid*, **25**, 215-219.
16. Sergeeva, A. V., and Galkin, A. P. (2020) Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance, *Curr. Genet.*, doi: 10.1007/s00294-020-01079-7.
17. Galkin, A. P., Velizhanina, M. E., Sopova, Y. V., Shenfeld, A. A., and Zadorsky, S. P. (2018) Prions and non-infectious amyloids of mammals – similarities and differences, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1184-1195.
18. Baxa, U. (2008) Structural basis of infectious and non-infectious amyloids, *Curr. Alzheimer Res.*, **5**, 308-318.
19. Shewmaker, F., McGlinchey, R. P., and Wickner, R. B. (2011) Structural insights into functional and pathological amyloid, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16533-16540.

20. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 15-22.
21. Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L., and Fink, A. L. (2001) Is Congo red an amyloid-specific dye? *J. Biol. Chem.*, **276**, 22715-22721.
22. Westermark, G. T., Johnson, K. H., and Westermark, P. (1999) Staining methods for identification of amyloid in tissue, *Methods Enzymol.*, **309**, 3-25.
23. Tayeb-Fligelman, E., Tabachnikov, O., Moshe, A., Goldshmidt-Tran, O., Sawaya, M. R., Coquelle, N., Colletier, J.-P., and Landau, M. (2017) The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSMα3 reveals a cross-α amyloid-like fibril, *Science*, **355**, 831-833.
24. Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 301-307.
25. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2017) Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 27-68.
26. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., and Dobson, C. M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 384-396.
27. Pepys, M. B. (2006) Amyloidosis, *Annu. Rev. Med.*, **57**, 223-241.
28. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333-366.
29. Andersson, K., Olofsson, A., Nielsen, E. H., Svehag, S.-E., and Lundgren, E. (2002) Only amyloidogenic intermediates of transthyretin induce apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 309-314.
30. Hartley, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid β-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons, *J. Neurosci.*, **19**, 8876-8884.
31. Shi, J., Guan, J., Jiang, B., Brenner, D. A., del Monte, F., Ward, J. E., Connors, L. H., Sawyer, D. B., Semigran, M. J., Macgillivray, T. E., Seldin, D. C., Falk, R., and Liao, R. (2010) Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 MAPK pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 4188-4193.
32. Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.-G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., Schätzl, H., and Lasmézas, C. I. (2007) *In vitro* and *in vivo* neurotoxicity of prion protein oligomers, *PLoS Pathog.*, **3**, e125.
33. Campioni, S., Mannini, B., Zampagni, M., Pensalfini, A., Parrini, C., Evangelisti, E., Relini, A., Stefani, M., Dobson, C. M., Cecchi, C., and Chiti, F. (2010) A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 140-147.
34. Milani, P., Merlini, G., and Palladini, G. (2018) Light chain amyloidosis, *Infect. Dis.*, **10**, e2018022.
35. Merlini, G., Dispenzieri, A., Sanchorawala, V., Schönland, S. O., Palladini, G., Hawkins, P. N., and Gertz, M. A. (2018) Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis, *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **4**, 38.
36. Nasr, S. H., Said, S. M., Valeri, A. M., Sethi, S., Fidler, M. E., Cornell, L. D., Gertz, M. A., Dispenzieri, A., Buadi, F. K., Vrana, J. A., Theis, J. D., Dogan, A., and Leung, N. (2013) The diagnosis and characteristics of renal heavy-chain and heavy/light-chain amyloidosis and their comparison with renal light-chain amyloidosis, *Kidney Int.*, **83**, 463-470.
37. Ando, Y., Coelho, T., Berk, J. L., Cruz, M. W., Ericzon, B.-G., Ikeda, S., Lewis, W. D., Obici, L., Planté-Bordeneuve, V., Rapezzi, C., Said, G., and Salvi, F. (2013) Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians, *Orphanet J. Rare Dis.*, **8**, 31.
38. Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y., and Sun, P. D. (2014) Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 5189-5194.
39. Morris, A. D., Smith, R. N., and Stone, J. R. (2019) The pathology and changing epidemiology of dialysis-related cardiac beta-2 microglobulin amyloidosis, *Cardiovasc. Pathol.*, **42**, 30-35.
40. Eriksson, M., Schönland, S., Yumlu, S., Hegenbart, U., von Hutten, H., Gioeva, Z., Lohse, P., Büttner, J., Schmidt, H., and Röcken, C. (2009) Hereditary apolipoprotein AI-associated amyloidosis in surgical pathology specimens, *J. Mol. Diagnostics*, **11**, 257-262.
41. Gerasimova, E. M., Fedotov, S. A., Kachkin, D. V., Vashukova, E. S., Glotov, A. S., Chernoff, Y. O., and Rubel, A. A. (2019) Protein misfolding during pregnancy: new approaches to preeclampsia diagnostics, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6183.
42. Srinivasan, R., Jones, E. M., Liu, K., Ghiso, J., Marchant, R. E., and Zagorski, M. G. (2003) pH-dependent amyloid and protofibril formation by the ABri peptide of familial British dementia, *J. Mol. Biol.*, **333**, 1003-1023.
43. Ghiso, J. A., Holton, J., Miravalle, L., Calero, M., Lashley, T., Vidal, R., Houlden, H., Wood, N., Neubert, T. A., Rostagno, A., Plant, G., Révész, T., and Frangione, B. (2001) Systemic amyloid deposits in familial British dementia, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43909-43914.
44. Srinivasan, R., Marchant, R. E., and Zagorski, M. G. (2004) ABri peptide associated with familial British dementia forms annular and ring-like protofibrillar structures, *Amyloid*, **11**, 10-13.
45. Coomaraswamy, J., Kilger, E., Wölfing, H., Schäfer, C., Kaeser, S. A., Wegenast-Braun, B. M., Hefendehl, J. K., Wolburg, H., Mazzella, M., Ghiso, J., Goedert, M., Akiyama, H., Garcia-Sierra, F., Wolfer, D. P., Mathews, P. M., and Jucker, M. (2010) Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7969-7974.
46. Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J. L., Bek, T., Bojsen-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J., and Frangione, B. (2000) A decamer duplication in the 3′ region of the *BRI* gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4920-4925.
47. Davies, H. A., Wilkinson, M. C., Gibson, R. P., and Middleton, D. A. (2014) Expression and purification of the aortic amyloid polypeptide medin, *Protein Expr. Purif.*, **98**, 32-37.
48. Khurana, R., Agarwal, A., Bajpai, V. K., Verma, N., Sharma, A. K., Gupta, R. P., and Madhusudan, K. P. (2004) Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma, *Endocrinology*, **145**, 5465-5470.
49. Pedrote, M. M., Motta, M. F., Ferretti, G. D. S., Norberto, D. R., Spohr, T. C. L. S., Lima, F. R. S., Gratton, E., Silva, J. L., and de Oliveira, G. A. P. (2020) Oncogenic gain of function in glioblastoma is linked to mutant p53 amyloid oligomers, *iScience*, **23**, 100820.
50. Levine, S. N., Ishaq, S., Nanda, A., Wilson, J. D., and Gonzalez-Toledo, E. (2013) Occurrence of extensive spherical amyloid deposits in a prolactin-secreting pituitary macroadenoma: a radiologic-pathologic correlation, *Ann. Diagn. Pathol.*, **17**, 361-366.

51. Chuang, E., Hori, A. M., Hesketh, C. D., and Shorter, J. (2018) Amyloid assembly and disassembly, *J. Cell Sci.*, **131**, jcs189928.
52. Millucci, L., Ghezzi, L., Bernardini, G., Braconi, D., Tanganelli, P., and Santucci, A. (2012) Prevalence of isolated atrial amyloidosis in young patients affected by congestive heart failure, *Sci. World J.*, **2012**, 1-8.
53. Linke, R. P., Joswig, R., Murphy, C. L., Wang, S., Zhou, H., Gross, U., Rocken, C., Westermark, P., Weiss, D. T., and Solomon, A. (2005) Senile seminal vesicle amyloid is derived from semenogelin I, *J. Lab. Clin. Med.*, **145**, 187-193.
54. Yanamandra, K., Alexeyev, O., Zamotin, V., Srivastava, V., Shchukarev, A., Brorsson, A.-C., Tartaglia, G. G., Vogl, T., Kayed, R., Wingsle, G., Olsson, J., Dobson, C. M., Bergh, A., Elgh, F., and Morozova-Roche, L. A. (2009) Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate, *PLoS One*, **4**, e5562.
55. Caubet, C., Bousset, L., Clemmensen, O., Sourigues, Y., Bygum, A., Chavanas, S., Coudane, F., Hsu, C., Betz, R. C., Melki, R., Simon, M., and Serre, G. (2010) A new amyloidosis caused by fibrillar aggregates of mutated corneodesmosin, *FASEB J.*, **24**, 3416-3426.
56. Miura, Y., Harumiya, S., Ono, K., Fujimoto, E., Akiyama, M., Fujii, N., Kawano, H., Wachi, H., and Tajima, S. (2013) Galectin-7 and actin are components of amyloid deposit of localized cutaneous amyloidosis, *Exp. Dermatol.*, **22**, 36-40.
57. Inoue, K., Takahashi, M., Hamamoto, Y., Muto, M., and Ishihara, T. (2000) An immunohistochemical study of cytokeratins in skin-limited amyloidosis, *Amyloid*, **7**, 259-265.
58. Ozawa, D., Kaji, Y., Yagi, H., Sakurai, K., Kawakami, T., Naiki, H., and Goto, Y. (2011) Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T, *J. Biol. Chem.*, **286**, 10856-10863.
59. Ando, Y., Nakamura, M., Kai, H., Katsuragi, S., Terazaki, H., Nozawa, T., Okuda, T., Misumi, S., Matsunaga, N., Hata, K., Tajiri, T., Shoji, S., Yamashita, T., Haraoka, K., Obayashi, K., Matsumoto, K., Ando, M., and Uchino, M. (2002) A novel localized amyloidosis associated with lactoferrin in the cornea, *Lab. Invest.*, **82**, 757-766.
60. Gupta, Y., Singla, G., and Singla, R. (2015) Insulin-derived amyloidosis, *Indian J. Endocrinol. Metab.*, **19**, 174.
61. D'Souza, A., Theis, J. D., Vrana, J. A., and Dogan, A. (2014) Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration, *Amyloid*, **21**, 71-75.
62. Chen, G., Xu, T., Yan, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, H. E. (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development, *Acta Pharmacol. Sin.*, **38**, 1205-1235.
63. Murphy, M. P., and LeVine, H. (2010) Alzheimer's disease and the amyloid-β peptide, *J. Alzheimer's Dis.*, **19**, 311-323.
64. Qiang, W., Yau, W.-M., Lu, J.-X., Collinge, J., and Tycko, R. (2017) Structural variation in amyloid-β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes, *Nature*, **541**, 217-221.
65. Giasson, B. I., Lee, V. M.-Y., and Trojanowski, J. Q. (2003) Interactions of amyloidogenic proteins, *Neuromolecular Med.*, **4**, 49-58.
66. Lim, S., Haque, M. M., Kim, D., Kim, D. J., and Kim, Y. K. (2014) Cell-based models to investigate Tau aggregation, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **12**, 7-13.
67. Kim, W. S., Kågedal, K., and Halliday, G. M. (2014) Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases, *Alzheimer's Res. Ther.*, **6**, 73.
68. Goedert, M., Jakes, R., and Spillantini, M. G. (2017) The synucleinopathies: twenty years on, *J. Parkinson's Dis.*, **7**, S51-S69.
69. Mead, S., and Reilly, M. M. (2015) A new prion disease: relationship with central and peripheral amyloidoses, *Nat. Rev. Neurol.*, **11**, 90-97.
70. Pansarasa, O., Bordoni, M., Diamanti, L., Sproviero, D., Gagliardi, S., and Cereda, C. (2018) SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis: "ambivalent" behavior connected to the disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1345.
71. Dragoš, A., Kovács, Á. T., and Claessen, D. (2017) The role of functional amyloids in multicellular growth and development of gram-positive bacteria, *Biomolecules*, **7**, 60.
72. Valsecchi, I., Dupres, V., Stephen-Victor, E., Guijarro, J. I., Gibbons, J., Beau, R., Bayry, J., Coppee, J.-Y., Lafont, F., Latgé, J.-P., and Beauvais, A. (2017) Role of hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*, *J. Fungi*, **4**, 2.
73. Pham, C. L. L., Rey, A., Lo, V., Soulès, M., Ren, Q., Meisl, G., Knowles, T. P. J., Kwan, A. H., and Sunde, M. (2016) Self-assembly of MPG1, a hydrophobin protein from the rice blast fungus that forms functional amyloid coatings, occurs by a surface-driven mechanism, *Sci. Rep.*, **6**, 25288.
74. Lo, V. C., Ren, Q., Pham, C. L. L., Morris, V. K., Kwan, A. H., and Sunde, M. (2014) Fungal hydrophobin proteins produce self-assembling protein films with diverse structure and chemical stability, *Nanomater.*, **4**, 827-843.
75. Morris, V. K., Ren, Q., Macindoe, I., Kwan, A. H., Byrne, N., and Sunde, M. (2011) Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 15955-15963.
76. Rauceo, J. M., Gaur, N. K., Lee, K.-G., Edwards, J. E., Klotz, S. A., and Lipke, P. N. (2004) Global cell surface conformational shift mediated by a *Candida albicans* adhesin, *Infect. Immun.*, **72**, 4948-4955.
77. Otoo, H. N., Lee, K. G., Qiu, W., and Lipke, P. N. (2008) *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences, *Eukaryot. Cell*, **7**, 776-782.
78. Dueholm, M. S., Albertsen, M., Otzen, D., and Nielsen, P. H. (2012) Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure, *PLoS One*, **7**, e51274.
79. Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P., and Chapman, M. R. (2012) Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids, *Trends Microbiol.*, **20**, 66-73.
80. Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J. A., Matthews, S., Penades, J. R., Lasa, I., and Valle, J. (2016) Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals, *PLoS Pathog.*, **12**, e1005711.
81. Alteri, C. J., Xicohténcatl-Cortes, J., Hess, S., Caballero-Olín, G., Girón, J. A., and Friedman, R. L. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5145-5150.
82. Besingi, R. N., Wenderska, I. B., Senadheera, D. B., Cvitkovitch, D. G., Long, J. R., Wen, Z. T., and Brady, L. J. (2017) Functional amyloids in *Streptococcus mutans*, their use as targets of biofilm inhibition and initial characterization of SMU_63c, *Microbiology*, **163**, 488-501.
83. Collinson, S. K., Emödy, L., Müller, K. H., Trust, T. J., and Kay, W. W. (1991) Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*, *J. Bacteriol.*, **173**, 4773-4781.
84. Doran, J. L., Collinson, S. K., Burian, J., Sarlós, G., Todd, E. C., Munro, C. K., Kay, C. M., Banser, P. A., Peterkin, P. I., and Kay, W. W. (1993) DNA-based diagnos-

tic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae, *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2263-2273.
85. Wang, Y., Jiang, J., Gao, Y., Sun, Y., Dai, J., Wu, Y., Qu, D., Ma, G., and Fang, X. (2018) *Staphylococcus epidermidis* small basic protein (Sbp) forms amyloid fibrils, consistent with its function as a scaffolding protein in biofilms, *J. Biol. Chem.*, **293**, 14296-14311.
86. Ling, S., Li, C., Adamcik, J., Shao, Z., Chen, X., and Mezzenga, R. (2014) Modulating materials by orthogonally oriented β-strands: composites of amyloid and silk fibroin fibrils, *Adv. Mater.*, **26**, 4569-4574.
87. Humenik, M., Smith, A. M., Arndt, S., and Scheibel, T. (2015) Ion and seed dependent fibril assembly of a spidroin core domain, *J. Struct. Biol.*, **191**, 130-138.
88. Berthelot, K., Lecomte, S., Estevez, Y., Coulary-Salin, B., and Peruch, F. (2014) Homologous *Hevea brasiliensis* REF (Hevb1) and SRPP (Hevb3) present different auto-assembling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 473-485.
89. Berthelot, K., Lecomte, S., Estevez, Y., Coulary-Salin, B., Bentaleb, A., Cullin, C., Deffieux, A., and Peruch, F. (2012) Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties, *PLoS One*, **7**, e48065.
90. Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F. K.-M., and Wu, H. (2012) The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis, *Cell*, **150**, 339-350.
91. Wu, X.-N., Yang, Z.-H., Wang, X.-K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., and Han, J. (2014) Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis, *Cell Death Differ.*, **21**, 1709-1720.
92. Kajava, A. V., Klopffleisch, K., Chen, S., and Hofmann, K. (2014) Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prion-forming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s, *Sci. Rep.*, **4**, 7436.
93. Liebman, S. W., and Chernoff, Y. O. (2012) Prions in yeast, *Genetics*, **191**, 1041-1072.
94. Seuring, C., Greenwald, J., Wasmer, C., Wepf, R., Saupe, S. J., Meier, B. H., and Riek, R. (2012) The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility, *PLoS Biol.*, **10**, e1001451.
95. Loquet, A., and Saupe, S. J. (2017) Diversity of amyloid motifs in NLR signaling in fungi, *Biomolecules*, **7**, 38.
96. Daskalov, A., Habenstein, B., Sabaté, R., Berbon, M., Martinez, D., Chaignepain, S., Coulary-Salin, B., Hofmann, K., Loquet, A., and Saupe, S. J. (2016) Identification of a novel cell death-inducing domain reveals that fungal amyloid-controlled programmed cell death is related to necroptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 2720-2725.
97. Kleino, A., Ramia, N. F., Bozkurt, G., Shen, Y., Nailwal, H., Huang, J., Napetschnig, J., Gangloff, M., Chan, F. K.-M., Wu, H., Li, J., and Silverman, N. (2017) Peptidoglycan-sensing receptors trigger the formation of functional amyloids of the adaptor protein Imd to initiate *Drosophila* NF-κB signaling, *Immunity*, **47**, 635-647.e6.
98. Gonçalves, A. P., Heller, J., Daskalov, A., Videira, A., and Glass, N. L. (2017) Regulated forms of cell death in fungi, *Front. Microbiol.*, **8**, 1837.
99. Hafner-Bratkovič, I. (2017) Prions, prionoid complexes and amyloids: the bad, the good and something in between, *Swiss Med. Wkly.*, **147**, w14424.
100. Mojsoska, B., and Jenssen, H. (2015) Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design, *Pharmaceuticals (Basel).*, **8**, 366-415.
101. Lyu, Y., Fitriyanti, M., and Narsimhan, G. (2019) Nucleation and growth of pores in 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)/cholesterol bilayer by antimicrobial peptides melittin, its mutants and cecropin P1, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **173**, 121-127.
102. Gazit, E., Miller, I. R., Biggin, P. C., Sansom, M. S., and Shai, Y. (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes, *J. Mol. Biol.*, **258**, 860-870.
103. Sood, R., Domanov, Y., Pietiäinen, M., Kontinen, V. P., and Kinnunen, P. K. J. (2008) Binding of LL-37 to model biomembranes: insight into target vs host cell recognition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 983-996.
104. Engelberg, Y., and Landau, M. (2020) The Human LL-37(17-29) Antimicrobial peptide reveals a functional supramolecular nanostructure, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.02.04.933432.
105. Auvynet, C., El Amri, C., Lacombe, C., Bruston, F., Bourdais, J., Nicolas, P., and Rosenstein, Y. (2008) Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9, *FEBS J.*, **275**, 4134-4151.
106. Caillon, L., Killian, J. A., Lequin, O., and Khemtémourian, L. (2013) Biophysical investigation of the membrane-disrupting mechanism of the antimicrobial and amyloid-like peptide dermaseptin S9, *PLoS One*, **8**, e75528.
107. Gössler-Schöfberger, R., Hesser, G., Muik, M., Wechselberger, C., and Jilek, A. (2009) An orphan dermaseptin from frog skin reversibly assembles to amyloid-like aggregates in a pH-dependent fashion, *FEBS J.*, **276**, 5849-5859.
108. Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5449-5453.
109. Zasloff, M., Martin, B., and Chen, H. C. (1988) Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 910-913.
110. Cruciani, R. A., Barker, J. L., Zasloff, M., Chen, H. C., and Colamonici, O. (1991) Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3792-3796.
111. Baker, M. A., Maloy, W. L., Zasloff, M., and Jacob, L. S. (1993) Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides, *Cancer Res.*, **53**, 3052-3057.
112. Ludtke, S., He, K., and Huang, H. (1995) Membrane thinning caused by magainin 2, *Biochemistry*, **34**, 16764-16769.
113. Jang, H., Arce, F. T., Mustata, M., Ramachandran, S., Capone, R., Nussinov, R., and Lal, R. (2011) Antimicrobial protegrin-1 forms amyloid-like fibrils with rapid kinetics suggesting a functional link, *Biophys. J.*, **100**, 1775-1783.
114. Gour, S., Kumar, V., Singh, A., Gadhave, K., Goyal, P., Pandey, J., Giri, R., and Yadav, J. K. (2019) Mammalian antimicrobial peptide protegrin-4 self assembles and forms amyloid-like aggregates: Assessment of its functional relevance, *J. Pept. Sci.*, **25**, e3151.
115. Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J., and Soto, C. (2005) Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein, *J. Biol. Chem.*, **280**, 26880-26885.
116. Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P. A., de Jong, M. F., Winter, M. G., Winter, S. E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N. H., Underwood, M. A., Tsolis, R. M., Young, G. M., Lu, W., Lehrer, R. I., Bäumler, A. J., and Bevins, C. L. (2012) Human α-defensin 6 promotes

mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets, *Science*, **337**, 477-481.
117. Gour, S., Kaushik, V., Kumar, V., Bhat, P., Yadav, S. C., and Yadav, J. K. (2016) Antimicrobial peptide (Cn-AMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloid-like fibrillar structure, *J. Pept. Sci.*, **22**, 201-207.
118. Wang, G. (2008) Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32637-32643.
119. Fahrner, R. L., Dieckmann, T., Harwig, S. S., Lehrer, R. I., Eisenberg, D., and Feigon, J. (1996) Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes, *Chem. Biol.*, **3**, 543-550.
120. De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Meirelles, M. N. L., Morozova-Roche, L. A., Dobson, C. M., and Ferreira, S. T. (2004) Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure, *FASEB J.*, **18**, 1099-1101.
121. Majumdar, A., Cesario, W. C., White-Grindley, E., Jiang, H., Ren, F., Khan, M. R., Li, L., Choi, E. M.-L., Kannan, K., Guo, F., Unruh, J., Slaughter, B., and Si, K. (2012) Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory, *Cell*, **148**, 515-529.
122. Si, K., Choi, Y.-B., White-Grindley, E., Majumdar, A., and Kandel, E. R. (2010) *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation, *Cell*, **140**, 421-435.
123. Stephan, J. S., Fioriti, L., Lamba, N., Colnaghi, L., Karl, K., Derkatch, I. L., and Kandel, E. R. (2015) The CPEB3 protein is a functional prion that interacts with the actin cytoskeleton, *Cell Rep.*, **11**, 1772-1785.
124. Heinrich, S. U., and Lindquist, S. (2011) Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal *Aplysia* cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2999-3004.
125. Hervas, R., Rau, M. J., Park, Y., Zhang, W., Murzin, A. G., Fitzpatrick, J. A. J., Scheres, S. H. W., and Si, K. (2020) Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila*, *Science*, **367**, 1230-1234.
126. Sopova, J. V., Koshel, E. I., Belashova, T. A., Zadorsky, S. P., Sergeeva, A. V., Siniukova, V. A., Shenfeld, A. A., Velizhanina, M. E., Volkov, K. V., Nizhnikov, A. A., Kachkin, D. V., Gaginskaya, E. R., and Galkin, A. P. (2019) RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form, *Sci. Rep.*, **9**, 18983.
127. Caudron, F., and Barral, Y. (2013) A super-assembly of Whi3 encodes memory of deceptive encounters by single cells during yeast courtship, *Cell*, **155**, 1244-1257.
128. Boke, E., Ruer, M., Wühr, M., Coughlin, M., Lemaitre, R., Gygi, S. P., Alberti, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., and Mitchison, T. J. (2016) Amyloid-like self-assembly of a cellular compartment, *Cell*, **166**, 637-650.
129. Iconomidou, V. A., Vriend, G., and Hamodrakas, S. J. (2000) Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo, *FEBS Lett.*, **479**, 141-145.
130. Iconomidou, V. A., Chryssikos, G. D., Gionis, V., Vriend, G., Hoenger, A., and Hamodrakas, S. J. (2001) Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkmoth chorion proteins, *FEBS Lett.*, **499**, 268-273.
131. Iconomidou, V. A., Chryssikos, G. D., Gionis, V., Galanis, A. S., Cordopatis, P., Hoenger, A., and Hamodrakas, S. J. (2006) Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptide tandemly repeating sequence of the central domain of silkmoth chorion proteins of the A-family, *J. Struct. Biol.*, **156**, 48-488.
132. Hamodrakas, S. J., Hoenger, A., and Iconomidou, V. A. (2004) Amyloid fibrillogenesis of silkmoth chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase, *J. Struct. Biol.*, **145**, 226-235.
133. Louros, N. N., Petronikolou, N., Karamanos, T., Cordopatis, P., Iconomidou, V. A., and Hamodrakas, S. J. (2014) Structural studies of "aggregation-prone" peptide-analogues of teleostean egg chorion ZPB proteins, *Biopolymers*, **102**, 427-436.
134. Egge, N., Muthusubramanian, A., and Cornwall, G. A. (2015) Amyloid properties of the mouse egg zona pellucida, *PLoS One*, **10**, e0129907.
135. Louros, N. N., Chrysina, E. D., Baltatzis, G. E., Patsouris, E. S., Hamodrakas, S. J., and Iconomidou, V. A. (2016) A common "aggregation-prone" interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins, *FEBS Lett.*, **590**, 619-630.
136. Carpenter, K., Bell, R. B., Yunus, J., Amon, A., and Berchowitz, L. E. (2018) Phosphorylation-mediated clearance of amyloid-like assemblies in meiosis, *Dev. Cell*, **45**, 392-405.e6.
137. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue, *PLoS Biol.*, **4**, e6.
138. Hoashi, T., Muller, J., Vieira, W. D., Rouzaud, F., Kikuchi, K., Tamaki, K., and Hearing, V. J. (2006) The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers, *J. Biol. Chem.*, **281**, 21198-21208.
139. Watt, B., van Niel, G., Fowler, D. M., Hurbain, I., Luk, K. C., Stayrook, S. E., Lemmon, M. A., Raposo, G., Shorter, J., Kelly, J. W., and Marks, M. S. (2009) *N*-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils, *J. Biol. Chem.*, **284**, 35543-35555.
140. McGlinchey, R. P., Shewmaker, F., McPhie, P., Monterroso, B., Thurber, K., and Wickner, R. B. (2009) The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13731-13736.
141. Leonhardt, R. M., Vigneron, N., Hee, J. S., Graham, M., and Cresswell, P. (2013) Critical residues in the PMEL/Pmel17 *N*-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 964-981.
142. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P. R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., and Riek, R. (2009) Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules, *Science*, **325**, 328-332.
143. Onoue, S., Ohshima, K., Debari, K., Koh, K., Shioda, S., Iwasa, S., Kashimoto, K., and Yajima, T. (2004) Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils, *Pharm. Res.*, **21**, 1274-1283.
144. Gul, S., Bahadir, B., Dusak, A., Kalayci, M., Edebali, N., and Acikgoz, B. (2009) Spherical amyloid deposition in a prolactin-producing pituitary adenoma, *Neuropathology*, **29**, 81-84.
145. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Kryndushkin, D., McGlinchey, R., Bateman, D., and Kelly, A. (2011) Prion diseases of yeast: amyloid structure and biology, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **22**, 469-475.
146. Newby, G. A., and Lindquist, S. (2013) Blessings in disguise: biological benefits of prion-like mechanisms, *Trends Cell Biol.*, **23**, 251-259.
147. Cox, B. S. (1965) ψ, a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast, *Heredity*, **20**, 505-521, doi: 10.1038/hdy.1965.65.

148. King, C.-Y., and Diaz-Avalos, R. (2004) Protein-only transmission of three yeast prion strains, *Nature*, **428**, 319-323.
149. Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000) Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast, *Mol. Cell*, **5**, 163-172.
150. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y., and Liebman, S. W. (2001) Prions affect the appearance of other prions: the story of [*PIN*$^+$], *Cell*, **106**, 171-182.
151. Du, Z., Park, K.-W., Yu, H., Fan, Q., and Li, L. (2008) Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Genet.*, **40**, 460-465.
152. Saifitdinova, A. F., Nizhnikov, A. A., Lada, A. G., Rubel, A. A., Magomedova, Z. M., Ignatova, V. V, Inge-Vechtomov, S. G., and Galkin, A. P. (2010) [*NSI*$^+$]: a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, **56**, 467-478.
153. Nizhnikov, A. A., Ryzhova, T. A., Volkov, K. V., Zadorsky, S. P., Sopova, J. V., Inge-Vechtomov, S. G., and Galkin, A. P. (2016) Interaction of prions causes heritable traits in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genet.*, **12**, e1006504.
154. Suzuki, G., Shimazu, N., and Tanaka, M. (2012) A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress, *Science*, **336**, 355-359.
155. Patel, B. K., Gavin-Smyth, J., and Liebman, S. W. (2009) The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 344-349.
156. Holmes, D. L., Lancaster, A. K., Lindquist, S., and Halfmann, R. (2013) Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion, *Cell*, **153**, 153-165.
157. Halfmann, R., Wright, J. R., Alberti, S., Lindquist, S., and Rexach, M. (2012) Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin, *Prion*, **6**, 391-399.
158. Chernova, T. A., Kiktev, D. A., Romanyuk, A. V., Shanks, J. R., Laur, O., Ali, M., Ghosh, A., Kim, D., Yang, Z., Mang, M., Chernoff, Y. O., and Wilkinson, K. D. (2017) Yeast short-lived actin-associated protein forms a metastable prion in response to thermal stress, *Cell Rep.*, **18**, 751-761.
159. Chernova, T. A., Romanyuk, A. V., Karpova, T. S., Shanks, J. R., Ali, M., Moffatt, N., Howie, R. L., O'Dell, A., McNally, J. G., Liebman, S. W., Chernoff, Y. O., and Wilkinson, K. D. (2011) Prion induction by the short-lived, stress-induced protein Lsb2 is regulated by ubiquitination and association with the actin cytoskeleton, *Mol. Cell*, **43**, 242-252.
160. Antonets, K. S., Belousov, M. V., Belousova, M. E., and Nizhnikov, A. A. (2019) The Gln3 transcriptional regulator of *Saccharomyces cerevisiae* manifests prion-like properties upon overproduction, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 441-451.
161. Rogoza, T., Goginashvili, A., Rodionova, S., Ivanov, M., Viktorovskaya, O., Rubel, A., Volkov, K., and Mironova, L. (2010) Non-Mendelian determinant [*ISP*+] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10573-10577.
162. Drozdova, P., Mironova, L., and Zhouravleva, G. (2016) Haploid yeast cells undergo a reversible phenotypic switch associated with chromosome II copy number, *BMC Genet.*, **17**, 152.
163. Matveenko, A. G., Drozdova, P. B., Belousov, M. V., Moskalenko, S. E., Bondarev, S. A., Barbitoff, Y. A., Nizhnikov, A. A., and Zhouravleva, G. A. (2016) SFP1 – mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1, *Genes to Cells*, **21**, 1290-1308.
164. Brown, J. C. S., and Lindquist, S. (2009) A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion, *Genes Dev.*, **23**, 2320-2332.
165. Chakravarty, A. K., Smejkal, T., Itakura, A. K., Garcia, D. M., and Jarosz, D. F. (2020) A non-amyloid prion particle that activates a heritable gene expression program, *Mol. Cell*, **77**, 251-265.e9.
166. Chakrabortee, S., Byers, J. S., Jones, S., Garcia, D. M., Bhullar, B., Chang, A., She, R., Lee, L., Fremin, B., Lindquist, S., and Jarosz, D. F. (2016) Intrinsically disordered proteins drive emergence and inheritance of biological traits, *Cell*, **167**, 369-381.e12.
167. Franzmann, T. M., Jahnel, M., Pozniakovsky, A., Mahamid, J., Holehouse, A. S., Nüske, E., Richter, D., Baumeister, W., Grill, S. W., Pappu, R. V., Hyman, A. A., and Alberti, S. (2018) Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness, *Science*, **359**, eaao5654.
168. Gomes, E., and Shorter, J. (2019) The molecular language of membraneless organelles, *J. Biol. Chem.*, **294**, 7115-7127.
169. Mitrea, D. M., and Kriwacki, R. W. (2016) Phase separation in biology; functional organization of a higher order, *Cell Commun. Signal.*, **14**, 1.
170. Audas, T. E., Audas, D. E., Jacob, M. D., Ho, J. J. D., Khacho, M., Wang, M., Perera, J. K., Gardiner, C., Bennett, C. A., Head, T., Kryvenko, O. N., Jorda, M., Daunert, S., Malhotra, A., Trinkle-Mulcahy, L., Gonzalgo, M. L., and Lee, S. (2016) Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis, *Dev. Cell*, **39**, 155-168.
171. Uversky, V. N., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., and Zaslavsky, B. (2015) Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates, *FEBS Lett.*, **589**, 15-22.
172. Uversky, V. N. (2017) Protein intrinsic disorder-based liquid-liquid phase transitions in biological systems: complex coacervates and membrane-less organelles, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **239**, 97-114.
173. Uversky, V. N. (2019) Supramolecular fuzziness of intracellular liquid droplets: liquid-liquid phase transitions, membrane-less organelles, and intrinsic disorder, *Molecules*, **24**, 3265.
174. Turoverov, K. K., Kuznetsova, I. M., Fonin, A. V., Darling, A. L., Zaslavsky, B. Y., and Uversky, V. N. (2019) Stochasticity of biological soft matter: emerging concepts in intrinsically disordered proteins and biological phase separation, *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 716-728.
175. Darling, A. L., Liu, Y., Oldfield, C. J., and Uversky, V. N. (2018) Intrinsically disordered proteome of human membrane-less organelles, *Proteomics*, **18**, e1700193.
176. Uversky, V. N. (2017) Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **44**, 18-30.
177. Babinchak, W. M., and Surewicz, W. K. (2020) Liquid-liquid phase separation and its mechanistic role in pathological protein aggregation, *J. Mol. Biol.*, **432**, 1910-1925.
178. Darling, A. L., Zaslavsky, B. Y., and Uversky, V. N. (2019) Intrinsic disorder-based emergence in cellular biology: physiological and pathological liquid-liquid phase transitions in cells, *Polymers (Basel)*, **11**, 990.
179. De Oliveira, G. A. P., Cordeiro, Y., Silva, J. L., and Vieira, T. C. R. G. (2019) Liquid–liquid phase transitions and amyloid aggregation in proteins related to cancer and neurodegenerative diseases, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **118**, 289-331.
180. Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., Mirzaei, H., Goldsmith, E. J., Longgood, J., Pei, J.,

Grishin, N. V., Frantz, D. E., Schneider, J. W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., Tycko, R., and McKnight, S. L. (2012) Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels, *Cell*, **149**, 753-767.
181. Gui, X., Luo, F., Li, Y., Zhou, H., Qin, Z., Liu, Z., Gu, J., Xie, M., Zhao, K., Dai, B., Shin, W. S., He, J., He, L., Jiang, L., Zhao, M., Sun, B., Li, X., Liu, C., and Li, D. (2019) Structural basis for reversible amyloids of hnRNPA1 elucidates their role in stress granule assembly, *Nat. Commun.*, **10**, 2006.
182. Chen, C., Ding, X., Akram, N., Xue, S., and Luo, S.-Z. (2019) Fused in sarcoma: properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases, *Molecules*, **24**, 1622.
183. Murray, D. T., Kato, M., Lin, Y., Thurber, K. R., Hung, I., McKnight, S. L., and Tycko, R. (2017) Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains, *Cell*, **171**, 615-627.e16.
184. Luo, F., Gui, X., Zhou, H., Gu, J., Li, Y., Liu, X., Zhao, M., Li, D., Li, X., and Liu, C. (2018) Atomic structures of FUS LC domain segments reveal bases for reversible amyloid fibril formation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 341-346.
185. Fushimi, K., Long, C., Jayaram, N., Chen, X., Li, L., and Wu, J. Y. (2011) Expression of human FUS/TLS in yeast leads to protein aggregation and cytotoxicity, recapitulating key features of FUS proteinopathy, *Protein Cell*, **2**, 141-149.
186. Chaudhury, A., Chander, P., and Howe, P. H. (2010) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: focus on hnRNP E1′s multifunctional regulatory roles, *RNA*, **16**, 1449-1462.
187. Kim, H. J., Kim, N. C., Wang, Y.-D., Scarborough, E. A., Moore, J., et al. (2013) Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS, *Nature*, **495**, 467-473.
188. Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., and Patel, B. K. (2019) Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 25.
189. Wegmann, S., Eftekharzadeh, B., Tepper, K., Zoltowska, K. M., Bennett, R. E., Dujardin, S., Laskowski, P. R., MacKenzie, D., Kamath, T., Commins, C., Vanderburg, C., Roe, A. D., Fan, Z., Molliex, A. M., Hernandez-Vega, A., Muller, D., Hyman, A.A., Mandelkow, E., Taylor, J. P., and Hyman, B. T. (2018) Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation, *EMBO J.*, **37**, e98049.
190. Kosolapova, A. O., Belousov, M. V., Sulatskaya, A. I., Belousova, M. E., Sulatsky, M. I., Antonets, K. S., Volkov, K. V., Lykholay, A. N., Shtark, O. Y., Vasileva, E. N., Zhukov, V. A., Ivanova, A. N., Zykin, P. A., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., Tikhonovich, I. A., and Nizhnikov, A. A. (2019) Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum*, *Biomolecules*, **9**, 694.
191. Danoff, E. J., and Fleming, K. G. (2015) Aqueous, unfolded OmpA forms amyloid-like fibrils upon self-association, *PLoS One*, **10**, e0132301.
192. Antonets, K. S., Volkov, K. V., Maltseva, A. L., Arshakian, L. M., Galkin, A. P., and Nizhnikov, A. A. (2016) Proteomic analysis of *Escherichia coli* protein fractions resistant to solubilization by ionic detergents, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 34-46.
193. Sahaya Rajan, J. J., Chinnappan Santiago, T., Singaravel, R., and Ignacimuthu, S. (2016) Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid, *Biotechnol. Lett.*, **38**, 689-700.
194. Villain, E., Nikekhin, A. A., and Kajava, A. V. (2019) Porins and amyloids are coded by similar sequence motifs, *Proteomics*, **19**, e1800075.
195. Kaur, G., Kaundal, S., Kapoor, S., Grimes, J. M., Huiskonen, J. T., and Thakur, K. G. (2018) *Mycobacterium tuberculosis* CarD, an essential global transcriptional regulator forms amyloid-like fibrils, *Sci. Rep.*, **8**, 10124.
196. Higurashi, T., Yagi, H., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2005) Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness, *J. Mol. Biol.*, **351**, 1057-1069.
197. Giraldo, R. (2007) Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17388-17393.
198. Gasset-Rosa, F., Coquel, A.-S., Moreno-Del Álamo, M., Chen, P., Song, X., Serrano, A. M., Fernández-Tresguerres, M. E., Moreno-Díaz de la Espina, S., Lindner, A. B., and Giraldo, R. (2014) Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone, *Mol. Microbiol.*, **91**, 1070-1087.
199. Fernández-Tresguerres, Moreno-Díaz de la Espina, S., Gasset-Rosa, F., and Giraldo, R. (2010) A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **77**, 1456-1469.
200. Torreira, E., Moreno-Del Álamo, M., Fuentes-Perez, M. E., Fernández, C., Martín-Benito, J., Moreno-Herrero, F., Giraldo, R., and Llorca, O. (2015) Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulates dimer to monomer transitions of RepA in DNA replication initiation, *Structure*, **23**, 183-189.
201. Belousov, M. V., Bondarev, S. A., Kosolapova, A. O., Antonets, K. S., Sulatskaya, A. I., Sulatsky, M. I., Zhouravleva, G. A., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., and Nizhnikov, A. A. (2018) M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils, *PLoS One*, **13**, e0191317.
202. Villar-Piqué, A., Sabaté, R., Lopera, O., Gibert, J., Torne, J. M., Santos, M., and Ventura, S. (2010) Amyloid-like protein inclusions in tobacco transgenic plants, *PLoS One*, **5**, e13625.
203. Hughes, M. P., Sawaya, M. R., Boyer, D. R., Goldschmidt, L., Rodriguez, J. A., Cascio, D., Chong, L., Gonen, T., and Eisenberg, D. S. (2018) Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked β sheets that assemble networks, *Science*, **359**, 698-701.
204. Nizhnikov, A. A., Alexandrov, A. I., Ryzhova, T. A., Mitkevich, O. V., Dergalev, A. A., Ter-Avanesyan, M. D., and Galkin, A. P. (2014) Proteomic screening for amyloid proteins, *PLoS One*, **9**, e116003.
205. Kryndushkin, D., Pripuzova, N., Burnett, B. G., and Shewmaker, F. (2013) Non-targeted identification of prions and amyloid-forming proteins from yeast and mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 27100-27111.
206. Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C. W., Necula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J. L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P., and Glabe, C. G. (2007) Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers, *Mol. Neurodegener.*, **2**, 18.
207. Alberti, S. (2017) The wisdom of crowds: regulating cell function through condensed states of living matter, *J. Cell Sci.*, **130**, 2789-2796.

AMYLOID AND AMYLOID-LIKE AGGREGATES: DIVERSITY AND TERM CRISIS*

Review

A. B. Matiiv[1], N. P. Trubitsina[1], A. G. Matveenko[1], Y. A. Barbitoff[1,2], G. A. Zhouravleva[1,3], and S. A. Bondarev[1,3]**

[1] *St. Petersburg State University, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, 199034 St. Petersburg, Russia; E mail: stanislavspbgu@gmail.com, s.bondarev@spbu.ru*

[2] *Bioinformatics Institute, 197342 St. Petersburg, Russia*

[3] *St. Petersburg State University, Faculty of Biology, Laboratory of Amyloid Biology, 199034 St. Petersburg, Russia*

Received July 16, 2020
Revised August 5, 2020
Accepted August 5, 2020

Active accumulation of the data on new amyloids continuing nowadays dissolves boundaries of the term “amyloid”. Currently, it is most often used to designate aggregates with cross-β structure. At the same time, amyloids also exhibit a number of other unusual properties, such as: detergent and protease resistance, interaction with specific dyes, and ability to induce transition of some proteins from a soluble form to an aggregated one. The same features have been also demonstrated for the aggregates lacking cross-β structure, which are commonly called “amyloid-like” and combined into one group, although they are very diverse. We have collected and systematized information on the properties of more than two hundred known amyloids and amyloid-like proteins with emphasis on conflicting examples. In particular, a number of proteins in membraneless organelles form aggregates with cross-β structure that are morphologically indistinguishable from the other amyloids, but they can be dissolved in the presence of detergents, which is not typical for amyloids. Such paradoxes signify the need to clarify the existing definition of the term amyloid. On the other hand, the demonstrated structural diversity of the amyloid-like aggregates shows the necessity of their classification.

Keywords: amyloids, amyloid-like aggregates, cross-β structure, prions

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1240 – 1255

УДК 57.085.23

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК С СОХРАНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА: ПРЕИМУЩЕСТВО ИЛИ ОГРАНИЧЕНИЕ?

Обзор

© 2020 Е.М. Самойлова*, В.П. Баклаушев

Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682 Москва, Россия; электронная почта: samoyket@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2020
После доработки 28.07.2020
Принята к публикации 05.08.2020

С момента первого описания старения и возраста клеток Хейфликом и Мурхедом в 1961 году наше понимание этих процессов значительно расширилось. Помимо укорочения теломерных концов, колоссальное значение в процессе старения имеют эпигенетические изменения профиля метилирования ДНК. В аспекте создания технологии репрограммирования клеток вопросы эпигенетического возраста и процесса старения приобретают особую актуальность. Два принципиально различных подхода к репрограммированию: создание клеток с индуцированной плюрипотентностью (ИПСК) и прямая трансдифференцировка по-разному влияют на эпигенетический возраст клетки. Считается, что при получении ИПСК возраст клетки, в частности профиль метилирования ДНК, «обнуляется», а при прямой трансдифференцировке – сохраняется. Понимание биологической роли метилирования ДНК в развитии, поддержании функциональной активности, тканевом и клеточном разнообразии, модификациях нейронных сетей в процессе обучения и в инволюционных процессах, сопровождающих старение, крайне важно для создания адекватных моделей заболеваний нервной системы. Прямое репрограммирование является и альтернативой, и ценным дополнением к методике ИПСК как источник зрелых клеток для моделирования нейродегенеративных заболеваний, а также в качестве новой стратегии для *in vivo* заместительной терапии. Оптимизация технологии получения аутологичных клеток пациентов с использованием альтернативных методов прямого и непрямого репрограммирования с учётом состояния эпигенетических часов первичных клеток будет способствовать дальнейшему развитию регенеративной и персонифицированной медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регенеративная медицина, эпигенетические часы, прямое репрограммирование, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, теломеры, метилом.

DOI: 10.31857/S0320972520090055

ВВЕДЕНИЕ

Люди являются исключительно долгоживущими по сравнению с другими приматами, с предполагаемой максимальной продолжительностью жизни 115 лет [1]. Это чрезвычайное долголетие отражается на всех постмитотических клетках, создавая уникальные предпосылки для возрастных заболеваний, таких как опухоли, нейродегенерации, диабет и другие метаболические болезни. Исследованиям процесса старения и его взаимосвязи с заболеваниями посвящено немало работ [2–5], но эта проблема слишком сложна и многогранна для создания универсальной концепции [3]. Средний возраст населения планеты продолжает увеличиваться, и возрастные заболевания становятся основным бременем для системы здравоохранения. Это, в свою очередь, создаёт потребность в модельных системах гериатрической патологии, необходимых для изучения возрастных факторов клеточной дисфункции и болезней. Процессы развития возрастных заболеваний описываются теорией «множественных попаданий», суммар-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ТФ – транскрипционный фактор; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; Ascl1 – Achaete-scute homolog 1; BAM – Brn2/Ascl1/Myt1L; Brn2 – домен POU класс 3, транскрипционный фактор 2; CpG – 5′ цитозин-фосфат-гуанин-3′ динуклеотид; CH – динуклеотид цитозина и аденина (A) или тимина (T) или цитозина (C); mCH – метилированный динуклеотид, где H может быть аденин (A), цитозин (C) или тимин (T); hmC – гидроксиметилцитозин, hmCG – динуклеотид гидроксиметилцитозингуанина; H3K4me3 – триметилирование лизина 4 в гистоне H3; H3K27me3 – триметилирование лизина 27 в гистоне H3; 5mC – 5-метилцитозин; Myt1L – миелиновый транскрипционный фактор 1 типа; NeuroD1 – нейрогенная дифференцировка; REST – фактор транскрипционного репрессора нейрональных генов; TL – длина теломер.

* Адресат для корреспонденции.

но вызывающих дисфункцию; одним из этих «попаданий» является, безусловно, эпигенетическое старение, в то время как другие «попадания» представляют собой генетическую предрасположенность, факторы окружающей среды, особенности поведения, вредные привычки и пр. [6, 7]. Моделирование старения на животных сильно ограничено вследствие относительно короткого срока их жизни, в связи с чем создание эффективных *in vitro* моделей на клетках и органоидах человека для изучения процесса старения и патогенеза возрастных болезней является весьма актуальной задачей.

Для создания модельных систем заболеваний *in vitro* применяются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые получают из первичных клеток человека переводом в плюрипотентное (эмбриональное) состояние посредством временной экспрессии транскрипционных факторов Яманаки: (OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), KLF4 (Kruppel-like factor 4), SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2) и C-MYC (протоонкоген MYC) (OKSM)) [8]. Полученные ИПСК могут быть дифференцированы в различные типы целевых клеток, такие как нейроны, миоциты, гепатоциты и другие, что позволяет исследовать клеточные процессы в контексте интересующего заболевания [9]. Однако факторы плюрипотентности обнуляют эпигенетические характеристики исходных клеток, что делает их малоподходящими для моделирования возрастных заболеваний. В качестве альтернативы может применяться метод прямого репрограммирования (трансдифференцировки) одного соматического типа клеток в другой, что позволяет сохранить возрастные эпигенетические сигнатуры клеток и точнее смоделировать течение болезни [10–12].

Существует множество клеточных и системных маркеров, определяющих возрастные изменения. Изначально процесс репликативного старения объяснялся невосстанавливаемым укорочением теломерных участков хромосом [13], однако позже было показано, что процесс старения клетки и организма гораздо более разнообразен. Так, накопление повреждений ДНК и снижение функциональной активности митохондрий могут способствовать нарушению обмена веществ [14]. Дополнительный вклад в старение вносят изменение морфологии клеток, метаболические изменения, потеря потенциала дифференцировки, активация сигнальных путей p53/p21CIP1 и p16INK4A/pRb, повышение активности β-галактозидазы, связанной со старением (SA-β-gal), образование связанных со старением гетерохроматических очагов (SAHF) и ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP) [15–17]. Также для процесса старения клетки характерны нарушения механизмов усвоения питательных веществ, связанные с нарушениями пути передачи сигналов инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) (IIS) и его нисходящих факторов транскрипции FOXO (forkhead box protein O) и mTOR (мишень рампомицина млекопитающих), снижение активности сиртуинов и аденозинмонофосфат (АМФ)-киназ [16]. В целом, стареющие клетки демонстрируют характерный секреторный фенотип, который способствует низкоуровневому системному воспалению и, вероятно, создает эффект свидетеля для остальных клеток через паракринную передачу. К факторам, формирующим такой фенотип, относятся провоспалительные цитокины (IL-6, TNF-α и пр.), IGFBP3 (инсулиноподобный белок 3, связывающий фактор роста), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), трансформирующий фактор роста- β (TGFβ) и пр. [16]. Помимо общих молекулярных маркеров старения выделяют и целый ряд биохимических предикторов, таких как повышенные уровни С-реактивного белка, глюкозы, холестерина, липопротеинов низкой плотности, щелочной фосфатазы, сывороточного альбумина и пр. [6]. Однако очевидно, что эти общие молекулярные и биохимические маркеры не являются специфичными для процесса старения и встречаются при подавляющем большинстве заболеваний, что делает невозможным использование их в качестве самодостаточных биомаркеров старения. Не меньшую роль в старении играет метилирование ДНК. Показано, что в процессе старения происходит массивное гипометилирование ДНК, и лишь определенные сайты становятся гиперметилированными [18]. При этом часть паттернов возрастного метилирования тканеспецифична [19]. Поэтому выявление наиболее общего и точного маркера старения долгое время было Святым Граалем для специалистов в этой области. Американская федерация исследований старения (AFAR) сформулировала несколько критериев биомаркера старения [20, 21].

1) Биомаркер должен предсказывать скорость старения. Другими словами, он должен описывать положение человека в каждый хронологический момент его жизни и быть лучшим предиктором продолжительности жизни, чем биологический возраст.

2) Биомаркер должен описывать механизм, который лежит в основе процесса старения, а не последствия болезни.

3) Биомаркер должен быть доступен для исследований при минимальной инвазивности.

4) Биомаркер должен быть универсальным для людей и лабораторных животных (в идеале – мелких лабораторных, таких как мыши и крысы).

К сожалению, на данный момент не существует ни одного биомаркера старения, удовлетворяющего этим критериям. Имеется несколько основных кандидатов, из которых наиболее исследованными являются длина теломер и метилирование ДНК. Старение и возрастные заболевания затрагивают все ткани и системы организма по-разному, и объять необъятное невозможно, поэтому в нашем обзоре мы сосредоточимся на наиболее актуальном, с нашей точки зрения, аспекте: старении центральной нервной системы и моделировании нейродегенеративных заболеваний путём клеточного репрограммирования.

ТЕЛОМЕРНЫЕ КОНЦЫ: ЧАСЫ ЖИЗНИ КЛЕТКИ?

Теломеры представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности на конце хромосом, которые укорачиваются при репликации соматических клеток. Репликативные ДНК-полимеразы не обладают способностью полностью реплицировать концевые участки линейных молекул ДНК, так что этот процесс контролируется специализированной ДНК-полимеразой, известной как теломераза. Большинство соматических клеток млекопитающих не экспрессируют теломеразу, что приводит к прогрессирующему с каждым делением клетки укорочению теломерных концов. Истощение теломер объясняет ограниченную пролиферативную способность культивируемых *in vitro* клеток, так называемое репликативное старение или предел Хейфлика [22]. Таким образом, можно считать, что процесс укорочения теломер отсчитывает деления клетки. Еще одна проблема состоит в том, что даже в присутствии теломеразы разрывы в области теломерных концов не восстанавливаются общими механизмами репарации, так как у теломер эту функцию должны выполнять шелтерины – специфические белковые комплексы, защищающие теломеры от повреждений и регулирующие работу теломеразы. Поэтому повреждения компонентов шелтеринов приводит к нарушению репарации разрывов ДНК на концевых участках хромосом [23]. Так, мутации шелтеринов были обнаружены в некоторых случаях апластической анемии и врожденного дискератоза, характеризующихся феноменом ускоренного старения даже при нормальной длине теломер [2].

Изначально считалось, что именно процесс укорочения теломер является основным счетчиком старения клетки и организма. Von Zglinicki и Martin-Ruiz [24] показали, что длина теломер удовлетворяет нескольким критериям для биомаркера старения, так как она связана с базовой биологией клетки и коррелирует со старением и гериартрическими болезнями. Но впоследствии было показано, что укорочение теломерных концов подчас слабо коррелирует с хронологическим старением [25]. Lu et al. [26] исследовали метилирование ДНК теломерной и субтеломерной областей [формирование метки DNAmTL (метилирование ДНК в области теломерных концов)] лейкоцитов – наиболее частого источника данных о состоянии TL и показали, что метилирование в два раза точнее предсказывает возраст, чем длина теломерных участков. Также этот показатель гораздо точнее описывает влияние внешних негативных факторов (курение, инфекции и пр.) на скорость старения, чем TL. Более того, в ходе *in vitro* экспериментов на линиях клеток с теломеразной активностью [трансдуцированных лентивирусом с hTERT (обратная трансриптаза теломеразы человека)] они показали, что даже при восстановлении TL ферментом эпигенетический возраст клеток через метилирование продолжает отсчитываться, значения DNAmTL первичных фибробластов человека продолжали уменьшаться даже после того, как они стали иммортализованными. Ещё одной проблемой является использование теломер для оценки старения слабо делящихся или неделящихся клеток, например нейронов взрослого мозга.

Таким образом, несмотря на то что TL в некоторых случаях вполне адекватно позволяет судить о скорости старения организма [3], при оценке эпигенетического возраста более информативными могут быть паттерны метилирования ДНК.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ОНТОГЕНЕЗЕ

Метилирование ДНК с образованием 5-метилцитозина (5mC) является стабильной ковалентной модификацией, которая сохраняется в постмитотических клетках на протяжении всей их жизни, определяя их клеточную идентичность. Тем не менее статус метилирования у каждого из ~1 млрд цитозинов в геноме является динамическим, изменяемым в ходе роста и развития клеток, внешних воздействий и пр. В геноме млекопитающих динамические модификации 5mC преимущественно обнаруживаются в контексте цитозин-фосфат-гуанин-3′динуклеотида

(CpG). Всего в геноме человека насчитывается более 28 млн таких CpG динуклеотидов, и места их скопления формируют так называемые CpG-островки. Другие участки генома, которые также содержат CpG-динуклеотиды (но в меньшем количестве), называются «берега», «шельф» или «открытое море» – в зависимости от удаления от CpG-островка. В большинстве соматических клеток основная часть CpG (более 80%) метилирована, за исключением CpG-островков регуляторных последовательностей, которые в ходе развития могут показывать пониженный уровень метилирования [27]. То есть локальное гипометилирование может служить надежной сигнатурой промоторов и энхансеров, так как уровень метилирования для промоторов обычно не превышает 10%, а для энхансеров – 10–50% [28]. При этом сравнение профилей метилирования разных типов клеток показало, что у большинства нормальных клеток 15–21% CpG различаются по уровню метилирования [29]. CpG группируются в тканеспецифические дифференцированные метилированные области (DMR, Differentiated Metylation Regions), которые преимущественно обнаруживаются во внутригенных областях и в дистальных регуляторных регионах – энхансерах, сайтах связывания транскрипционных факторов (ТФ) [29, 30]. Наблюдения показывают, что большое количество DMR (20 000–100 000 в зависимости от типа ткани) отражает тканевое деметилирование, вызванное специфическим связыванием транскрипционных факторов. Это подтверждается экспериментами на эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) мыши с использованием инсуляторного белка CCCTC-связывающего фактора (CTCF) и транскрипционного репрессора нейрональных генов (REST, RE1-Silencing Transcription factor) [28]. Наличие интактного мотива CTCF является необходимым и достаточным для локального гипометилирования. Удаление REST приводило к увеличению 5mC в слабо метилированных областях, обычно связанных REST. Примечательно, что такое усиление 5mC может быть обращено вспять путем повторного введения REST. Интересно, что во время внутриутробного развития происходит массивное деметилирование 5mC и *de novo* метилирование происходит уже после рождения [31].

Динамическое метилирование ДНК характерно не только для CpG динуклеотидов, но было показано и для других пар динуклеотидов – mCH (метилированный динуклеотид), где H может быть A (аденин), C (цитозин) или T (тимин) [32]. Более того, для некоторых тканей и органов именно mCH является основным метилируемым динуклеотидом, например, в ЭСК и в нейронах [27, 33]. Примечательно, что в эмбриональных клетках и при получении ИПСК наиболее динамично менялось метилирование mCH, тогда как метилирование CpG оставалось практически неизменным [27]. Наличие интрагенного 5mCH (динуклеотид 5-метилцитозин-аденин (А)/тимин (Т)/цитозин (Ц)) положительно коррелирует с экспрессией генов в ЭСК человека, но отрицательно коррелирует с экспрессией генов в мозге [33].

Развитие и созревание мозга – сложноорганизованный процесс, который начинается в эмбриональном периоде и продолжается у людей вплоть до третьего десятилетия жизни [34]. Несмотря на многие исследования, посвященные изучению нейрогенеза и глиогенеза в эмбриональном и взрослом мозге, до сих пор нет полного понимания, какие молекулярные механизмы являются ключевыми в этих процессах. Особенно сложным для изучения оказался раздел эпигенетического контроля развития мозга. Динамические эпигенетические изменения наблюдаются во время развития мозга, созревания и обучения [33]. Исследование Lister et al. [33] показало, что основным динамическим паттерном метилирования в мозге является mCH. Метилирование динуклеотидов CH наиболее существенно происходит в нейронах в раннем детстве и в подростковом возрасте, становясь доминирующей формой метилирования ДНК в зрелых нейронах человека. Это показывает, что период синаптогенеза, в течение которого созревает нейронная цепь, сопровождается параллельным процессом крупномасштабной реконфигурации эпигенома нейрона. При этом имеет место двухфазное изменение паттернов метилирования в онтогенезе: в эмбриональном мозге происходит деметилирование и mCH исчезает по мере созревания нейронов (уровень mCH в генах обратно пропорционален уровню экспрессии контролируемого гена), и уже после рождения обновлённая сигнатура mCH во взрослых нейронах появляется *de novo*. mCH увеличивается наиболее быстро во время первичной фазы синаптогенеза в развивающемся постнатальном мозге, от 2 до 4 недель у мышей и в первые 2 года у людей с последующим более медленным накоплением mCH в позднем подростковом возрасте. Накопление mCH первоначально соответствует увеличению плотности синапсов в средней лобной извилине человека (синаптогенез длится от рождения до 5 лет), но впоследствии оно продолжает увеличиваться в течение периода подростковой синаптической корректировки, который у людей встречается в возрасте 5–16 лет [33]. Также в составе высоко экспрессируемых генов имеется достаточно

большое количество гидроксиметилцитозина (hmC) в контексте CG, который является промежуточным звеном в процессе деметилирования ДНК и наиболее динамичной формой метилированной метки, быстро переходящей при изменении условий как в полностью метилированную, так и полностью деметелированную формы [35]. При этом была показана прямая корреляция содержания hmC у плода и взрослой особи: высокий уровень внутригенного hmC на стадии внутриутробного развития сохранялся и во взрослых клетках [33]. Надо отметить, что hmC может быть достаточно стабильной модификацией, что потенциально указывает на её регуляторную роль. Разнообразие нейрональных и глиальных клеток в лобной коре может говорить об особенностях метилирования ДНК в различных типах клеток. Было показано, что нейроны содержат гораздо больше паттернов mCH по сравнению с глиальными клетками. При этом в глиальных клетках обогащение mCH происходит в генах, которые в нейронах CH гипометилированы, как, например, транскрипционный активатор Mef2c (миоцит-специфический фактор-энхансер 2C), играющий ключевую роль в процессах обучения и памяти, дифференцировке нейронов, синаптической пластичности и пр. [36, 37]. Это согласуется с концепцией о потенциальной роли mCH в репрессии транскрипции нейрональных генов в глиальном геноме [33]. И наоборот, гены, связанные с функцией глии, гиперметилированы в нейронах и гипометилированы в глиальных клетках [33]. Интересно, что ДНК-метилтрансфераза 3a (Dnmt3a), обеспечивающая процесс метилирования цитозина в пятой позиции, во взрослом мозге преимущественно работает с динуклеотидами CH, но не CG, что говорит о различии механизмов контроля этих двух процессов. Метилирование ДНК в промоторных областях и в телах генов участвует в регуляции экспрессии генов. Предполагается, что консервативные, специфичные для типа клеток паттерны метилирования ДНК могут быть связаны со специфическими нейрональными и глиальными клеточными процессами. Исследования показали, что в отличие от глиальных клеток в процессе развития мозга нейроны теряют внутригенное метилирование CG- и CH-пар и приобретают высокий уровень hmCG в нейрональных генах [33]. При этом экспрессия высоко конститутивных генов, не участвующих в нейрогенезе, не подвержена подобной регуляции, так же как и генов с низким уровнем экспрессии [33]. Все это демонстрирует, что динамическое метилирование ДНК в генах тесно связано с дифференциальной транскрипционной активностью в развитии мозга млекопитающих и специализации нервных клеток. Обратная зависимость, наблюдаемая между уровнем генного mCH и транскрипционной активностью, согласуется с концепцией, в которой внутригенное накопление mCH препятствует транскрипционной активности. Альтернативно процесс транскрипции может мешать метилированию mCH *de novo* или вызывать активное деметилирование mCH [27].

Глиальные паттерны mCG и mCH очень похожи на паттерны плода и раннего постнатального мозга [33]. Это указывает на то, что метилирование ДНК на ранних стадиях развития мозга млекопитающих может быть состоянием по умолчанию, которое в значительной степени сохраняется до зрелости в глиальных клетках, тогда как дифференцировка и созревание нейронов включают в себя обширную реконфигурацию ДНК-метилома, связанную со специализацией клеток. Также стоит отметить, что дискретные области, показывающие пониженный или повышенный уровень метилирования CG, связаны со специфическими локальными модификациями хроматина. Так, при гипометилировании наблюдаются модификации гистонов, характерные для активных энхансеров (H3K4me1 (метилирование лизина 4 в гистоне H3) и H3K27ac (ацетилирование лизина 27 в гистоне H3)), и повышенная гиперчувствительность к ДНКазе I (дизоксирибонуклеазе I), и гипометилирование CH [33].

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК: ХРОНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

Метилирование ДНК является динамической модификацией, и во многих сообщениях задокументированы возрастные изменения метилома [3, 7, 38]. Например, метилирование ДНК имеет тенденцию снижаться с возрастом на большей части ДНК, но повышаться на некоторых островках CpG, особенно в отношении генов-мишеней polycomb – белков, способных ремоделировать хроматин, генов-регуляторов транскрипции, развития и клеточной дифференцировки [39]. Основываясь на возрастных изменениях метилирования популяционно стабильных участков ДНК, несколько групп исследователей определили так называемые «часы» метилирования ДНК [18, 40]. Эпигенетические часы – это регрессионная модель, связывающая изменение уровня метилирования определенных CpG нуклеотидов с возрастом. Часы, построенные на метилировании ДНК, в настоящее время лучше оценивают фактический хроноло-

гический возраст, чем транскриптомные и протеомные данные или TL [3].

Первые эпигенетические часы были разработаны Hannum et al. [40] на основе оценки 71 CpG из ДНК мононуклеаров периферической крови. Следующие, более точные во многих аспектах, пан-тканевые эпигенетические часы были созданы Horvath S. [18] на основе оценки метилирования 353 CpG в ДНК, полученной из нескольких нормальных и опухолевых тканей. Комбинированный статус метилирования этих CpG показывает эпигенетический возраст, который коррелирует с хронологическим возрастом. Точность часов измеряется коэффициентом корреляции между фактическим хронологическим возрастом, измеренным возрастом и средней абсолютной разницей между фактическим и измеренным возрастом. Пан-тканевые эпигенетические часы с очень высокой точностью предсказывают хронологический возраст и скорость старения без учета внешних факторов воздействия и, как следует из названия, без особого уточнения по тканям. По определению, хронологические часы измеряют время, прошедшее с рождения. Следовательно, люди, родившиеся в один и тот же день, имеют одинаковый хронологический возраст на протяжении всей жизни независимо от образа жизни и наличия заболеваний и вредных привычек. Напротив, люди с одинаковым хронологическим возрастом могут иметь разный биологический возраст. Хотя биологический возраст и не является четко определенным, он определяет снижение функциональных возможностей тканей, органов и целого организма, связанных с наличием или отсутствием внешних факторов [41]. Несмотря на эти сложности, недавние исследования показали, что разница между кажущимся возрастом метилирования ДНК и истинным хронологическим возрастом отражает биологический возраст, по крайней мере до некоторой степени. Также биологический возраст часто строится с учетом специфики ткани и органа. Например, ткань молочной железы у женщин имеет больший биологический возраст по сравнению с другими тканями организма и другой ритм эпигенетических часов в подростковом периоде под влиянием гормонов [42, 43]. Поэтому для более точного определения биологического возраста клеток и скорости старения («PhenoAge», «GrimAge») большинство современных эпигенетических часов являются либо специализированными по тканям, либо комбинированными с другими показателями, кроме метилирования ДНК [44, 45]. Например, недавно построенные часы метилирования ДНК с предсказанием смертности, названные «GrimAge», включают изменения, связанные с курением, посредством оценки курения по количеству пачек в год. Эти часы также включают определенные уровни белка в плазме, оцененные по метилированию ДНК, и это приводит к еще более точному прогнозу как продолжительности, так и качества жизни [45].

Существует немало исследований, показавших массивные эпигенетические нарушения в процессе развития рака [41], логично предположить, что метилирование ДНК регулирует динамическое равновесие генома и нивелирует повреждения ДНК, неизбежно возникающие в процессе жизни клетки. Возрастные изменения метилирования ДНК также могут быть вторичными по сравнению с другими изменениями в модификаторах хроматина и/или хроматине [46]. Модификации гистонов влияют на метилирование ДНК. Например, метилирование ДНК исключается из генных промоторов с помощью H3K4me3 (гистон H3, триметилирование лизина 4), но рекрутируется на генные тела и гетерохроматин с помощью H3K36me3 (гистон H3, триметилирование лизина 36) и H3K9me3 (гистон H3, триметилирование лизина 9) [47]. И наоборот, гипометилирование ДНК вызывает перераспределение активности белков polycomb и H3K27me3 (гистон H3, триметилирование лизина 27) [48]. С этой точки зрения, часы метилирования ДНК могут быть представлены как «часы эпигенетической сети», а изменения метилирования могут быть вторичными по отношению к другим эпигенетическим или даже связанным метаболическим изменениям [49], которые составляют эту сеть. Также в некоторых случаях биологические часы приравнивают к «эпигенетическому дрейфу», так как они отражают межиндивидуальные вариации дисфункции тканей и риска болезней, то есть отражают эпигенетическое расхождение между людьми на фоне хронологического сходства.

Таким образом, понимание биологических основ метилирования ДНК, его роли в развитии, поддержании функциональной активности, тканевом и клеточном разнообразии эпигенетических модификациях нейронных сетей и в инволюционных процессах, сопровождающих старение, крайне важно для создания адекватных моделей нейродегенеративных заболеваний с учётом состояния эпигенетических часов модельных клеток.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ

Итак, для *in vitro* моделирования нейродегенеративных заболеваний и инволюционных

состояний, связанных со старением, необходим адекватный источник клеток [50]. Не менее актуальной задачей является поиск безопасного и экономически целесообразного источника аутологичных клеток для персонифицированной регенеративной терапии заболеваний и травм нервной системы, сопровождающихся гибелью нейронов и глиальных клеток и необратимым нарушением функции ЦНС [51].

Открытие технологии получения ИПСК около 15 лет назад привело к разработке многочисленных *in vitro* моделей заболеваний и потенциальных методов персонифицированной терапии [52]. Общая стратегия заключалась в том, чтобы перепрограммировать соматические клетки пациента, например фибробласты в ИПСК, а затем дифференцировать их в целевой тип клеток. Постоянно совершенствующиеся протоколы дифференцировки позволяют получить даже самые редкие и малочисленные типы терминально дифференцированных клеток, а в последние годы из ИПСК стали получать органоиды – сложные колонии клеток, отражающие особенности целых тканей и органов [53]. Однако у ИПСК есть существенный минус для моделирования возрастных заболеваний: процесс репрограммирования через стадию плюрипотентности (по сути – ЭСК) обнуляет возраст изначальной линии соматических клеток.

В качестве альтернативы перепрограммированию и дифференцировке ИПСК применяют стратегию так называемого прямого репрограммирования, также известного как трансдифференцировка, при которой сохраняются возрастные паттерны донорских клеток [9]. Транскрипционные факторы, микроРНК и малые молекулы используются, чтобы стимулировать терминально дифференцированные клетки напрямую трансформироваться в другой клеточный тип, минуя стадию плюрипотентности.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЧЕРЕЗ ИПСК И СТАРЕНИЕ НЕЙРОНОВ

Нейроны являются одними из самых долгоживущих клеток в организме, большинство из них генерируется в эмбриональном и раннем постнатальном периоде. Во взрослом мозге процесс нейрогенеза ограничен тремя зонами: субвентрикулярная зона, зубчатая извилина и обонятельные луковицы [54, 55]. Более того, если в эмбриональном мозге процесс нейрогенеза направлен на создание массива новых нейронов, то взрослый нейрогенез играет поддерживающую роль и сосредоточен в основном на генерации глиальных клеток [54]. В процессе жизни нейроны накапливают определенные возрастные изменения, способствующие развитию нейродегенерации, особенно при наличии врожденных генетических предпосылок. Ради восстановления ДНК на транскрипционно активных генах накапливаются некритичные повреждения ДНК и подавляются не жизненно важные транскрипционные пути [12]. Митохондрии с возрастом становятся все более уязвимыми, что приводит к увеличению продукции свободных активных форм кислорода (АФК), которые являются мощным ДНК-повреждающим фактором [14]. Таким образом, репарация ДНК может быть сильно снижена в процессе развития нейродегенерации [55]. Известно, что при боковом амиотрофическом склерозе и лобно-височной деменции мутации в белке FUS (Fused in Sarcoma) приводят к нарушениям целостности ДНК [12]. Интересно, что для нейронов характерен механизм индуцированного запуска транскрипции ранних генов нейронного ответа через двухцепочечные разрывы в целевых промоторах ранних генов [56]. Однако при болезни Альцгеймера этот процесс блокируется внеклеточным амилоидным белком β [56]. Кроме целостности и стабильности ДНК, в нейронах с возрастом изменяется проницаемость ядерных пор [57]. Со временем поры становятся все более проницаемыми, что ослабляет их регуляторную функцию относительно транскрипции и глобальной ядерной организации. Такие изменения не наблюдаются в молодых клетках и не моделируются искусственно, хотя известно, что при боковом амиотрофическом склерозе и лобно-височной деменции белки poly-PR, FUS и TDP-43 (TAR ДНК-связывающий белок 43) могут блокировать ядерные поры [12].

Очевидно, что при столь долгом сроке жизни нейроны должны обладать совершенными механизмами динамического контроля стабильности генома и транскрипционной активности, одним из которых является метилирование ДНК. В предыдущем разделе подробно описано, какие паттерны метилирования характеризуют возрастные изменения. Соотношение паттернов mC и hmC формирует уникальное динамическое равновесие, определяющее возраст клеток и скорость старения. Очевидно, что эти же механизмы оказывают значительное влияние на патогенез нейродегенеративных заболеваний.

Использование ИПСК и усовершенствованных стратегий дифференцировки позволило получить определенные типы нервных клеток, генетически принадлежащие пациентам, включая различные типы нейральных стволовых клеток (НСК), дофаминергические, глутаматергичес-

кие, ГАМКергические нейроны, двигательные нейроны, астроциты, олигодендроциты и многие другие типы клеток для моделирования возрастных заболеваний [58]. Для моделирования ряда заболеваний, в частности наследственных нейродегенераций, возраст моделируемых клеток не имеет значения [59, 60]. Однако в большинстве спорадических и обусловленных старением нейродегенеративных заболеваний эпигенетический возраст может быть одним из ключевых факторов патогенеза.

Технология репрограммирования через плюрипотентную стадию сопряжена с массивной эпигенетической перестройкой, в ходе которой не только меняется фенотип клетки, но и обнуляется возраст до эмбрионального [61, 62]. Olova et al. [63] показали, что даже при частичном непрямом репрограммировании, при котором нет устойчивой плюрипотентной стадии, обнуление возрастных эпигенетических сигнатур происходит в первые 10 дней репрограммирования – в период повышенной активности генов плюрипотентности, ранней экспрессии *NANOG* (ген гомеобоксного белка NANOG), *SALL4* (ген Sal-подобного белка 4), *ZFP42* (ген белка цинкового пальца 42), *TRA-1-60* (ген альфа-локуса рецептора Т-клеток), *UTF1* (ген недифференцированного транскрипционного фактора эмбриональных клеток 1), *DPPA4* (ген фактора развития плюрипотентности 4) и *LEFTY2* (ген фактора определения лево-право 2). Схожие результаты были продемонстрированы в работе Ocampo et al. [64], в которой авторы с помощью циклической индукции OKSM провели неполное репрограммирование клетки. При этом гены, кодирующие эти факторы, активировались на два дня, после чего следовал период покоя продолжительностью пять дней. Затем цикл активации повторялся снова и снова. В результате они показали обнуление эпигенетического возраста до раннего постнатального состояния без полной потери специализации клетки.

Даже использование всего двух трансформирующих факторов из коктейля Яманаки (SOX2 и c-MYC) без постоянной индукции оказалось достаточно, чтобы полученная в результате популяция клеток была по возрастным сигнатурам сходна с аналогичной популяцией, дифференцированной из ЭСК [65]. Такое омоложение ИПСК было также продемонстрировано на уровне изменения теломер [66, 67], изменения работы митохондрий и пр. [68, 69].

Вследствие такого «омоложения» репрограммированных клеток модели нейродегенеративных заболеваний, основанные на ИПСК, нуждаются в дополнительных стрессорах, имитирующих возрастные изменения. Например, в исследованиях с использованием ИПСК-производных дофаминергических нейронов для моделирования болезни Паркинсона последовательно использовались АФК или митохондриальные нейротоксины, такие как H_2O_2, 6-гидроксидофамин (OHDA), валиномицин или CCCP (карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон), для имитации возрастных нейрон-специфических нарушений [12]. Точно так же ингибирование протеасом с использованием таких соединений, как MG132, было необходимо для получения агрегатов белка в ИПСК-производных нейронах в модели болезни Гентингтона [70], а воздействие эксайтотоксического глутамата было необходимо для образования агатин-3 микроагрегатов в ИПСК-производных нейронах в модели болезни Мачадо–Джозефа [71]. Интересно, что генетические нарушения в генах *PS1* (photosystem 1) или *APP* (amyloid precursor protein), приводящие к ранней манифестации болезни Альцгеймера, изменяют транскрипцию амилоидного белка β без дополнительного влияния, но не вызывают гибели клеток, происходящей только после дополнительного эксайтотоксического действия глутамата [72]. Это свидетельствует о том, что при данной патологии аберрантный амилоидный белок уже присутствует в молодых нейронах, но серьезные нарушения в этих нейронах начинаются только в процессе старения клетки [73]. В отдельных исследованиях для моделирования возрастных изменений в ИПСК-производных нейронах использовали гиперэкспрессию белка прогерина, что приводило к индукции ряда маркеров старения, включая формирование фокусов γH2AX (член семейства гистонов H2AX) и H2K9me (метилирование лизина 9 в гистоне H2) [12, 74].

Очевидно, что различные подходы по искусственному «состариванию» ИПСК-производных клеток воспроизводят лишь отдельные феномены старения и не позволяют говорить о решении проблемы обнуления биологического возраста у нейронов, полученных из ИПСК.

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ С СОХРАНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ СИГНАТУР

В аспекте сохранения эпигенетического возраста хорошей альтернативой ИПСК является прямое репрограммирование клетки. Поскольку прямое репрограммирование минует стадию плюрипотентности, эпигенетические паттерны донорских клеток сохраняются и у конечной культуры. Первым исследованием, продемонстрировавшим эффективность такого

подхода, было превращение фибробластов в миобласты путем избыточной экспрессии MYOD1 (белок определения миобластов 1) [75]. В дальнейшем протоколы прямой трансдифференцировки одного типа соматических клеток в другой позволили получить клетки крови, нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты, клетки поджелудочной железы, макрофаги и пр. [76–80]. Репрограммирование мышиных фибробластов в функциональные индуцированные нейроны было впервые достигнуто путем сверхэкспрессии набора пронейральных факторов транскрипции, Bbn2, Ascl1 и Myt1L, также известных как BAM [79]. Через год те же авторы усовершенствовали протокол, добавив к BAM NeuroD1 [81]. С тех пор ученые далеко продвинулись в изучении механизмов, вовлеченных в прямое репрограммирование, и разработали немало протоколов на основе транскрипционных факторов, микроРНК и малых молекул для генерации нейронов, которые по паттерну экспрессии и электрофизиологической активности идентичны нейронам, полученным из ЭСК или ИПСК [51, 82, 83].

Надо понимать, что любое репрограммирование, в том числе прямое, провоцирует массивные эпигенетические изменения, обусловленные взаимодействием ТФ с ДНК. При этом некоторые ТФ взаимодействуют только с открытыми и гипометилированными областями хроматина, некоторые, наоборот, рекрутируются в своих целевых областях только при наличии метильных меток [33]. На основании этого сформировалась система иерархии ТФ по способности взаимодействовать с ДНК [83]. Первичные ТФ способны взаимодействовать с транскрипционно неактивными областями хроматина и рекрутировать туда вторичные ТФ. Было высказано предположение, что первичные ТФ могут вызывать локальное эпигенетическое ремоделирование [83].

В отличие от факторов Яманаки, которые также являются первичными ТФ, факторы прямого репрограммирования связывают конкретные области хроматина, не меняющиеся в процессе репрограммирования. Факторы Яманаки первоначально также связываются с сайтами-мишенями в исходном типе клетки, но в процессе репрограммирования меняют их и в конечном итоге связывают разные сайты в репрограммированных клетках [84, 85]. Одним из примеров данного феномена является Ascl1, чья принудительная экспрессия напрямую превращает фибробласты в постмитотические нейроны и приводит к снижению содержания 5mC в большинстве своих сайтов связывания [83]. Нейрогенин 2 (Ngn2) и NeuroD1 – еще два хорошо изученных пронейральных транскрипционных фактора, которые действуют как первичные ТФ при прямом репрограммировании фибробластов в индуцированные нейроны [86–88]. NeuroD1 связывает неметилированные CpG-богатые области и переводит H3K4me3/H3K27me3 из двухвалентного состояния в моновалентное H3K4me3 во время репрограммирования [87]. Данные о доступности хроматина позволяют предположить, что Brn2, Zfp238 (белок цинкового пальца 238), Sox8 (SRY-Box Transcription Factor 8) и Dlx3 (дистальный гомеобокс 3) являются одними из наиболее важных эндогенных вторичных ТФ, задействованных в пронейрональном репрограммировании [83, 89].

Интересно, что вторичные ТФ Prdm8 (PR/SET домен 8), Bhlhe22 (базовый член семейства Helix-Loop-Helix E22) и Brn2, которые являются прямыми генами-мишенями NeuroD1 в микроглии, могут также способствовать превращению микроглии в нейроны путем индукции экспрессии генов нейронов (*Brn2*) или репрессии генов микроглии (*Bhlhe22*, *Prdm8*) [87]. Несколько исследовательских групп использовали стратегию двойного первичного ТФ (Ascl1 и Ngn2), которая обеспечивает высокую эффективность репрограммирования даже старых фибробластов человека [90, 91]. Однако не все первичные ТФ одинаково хорошо взаимодействуют с хроматином разных типов клеток. Например, Ascl1 способен индуцировать превращение фибробластов, но не кератиноцитов в индуцированные нейроны. Это объясняется тем фактом, что первичные ТФ требуют более специфической эпигенетической сигнатуры для связывания с закрытым хроматином и существовавшими ранее модификациями гистонов, такими как трехвалентное состояние хроматина H3K4me1/H3K27ac/H3K9me3 в фибробластах, что является одной из причин, по которым Ascl1 индуцируют прямое преобразование только в фибробластах [83].

Теоретически иерархическую роль первичных ТФ могут сыграть малые молекулы, повышающие доступность ДНК трансформируемых клеток (VPA (вальпроевая кислота), RG108) [92], но на практике становится очевидно, что малые молекулы работают неадресно, так что с равной вероятностью могут повысить доступность областей как нейральных генов, так и любых других [93]. Интересно отметить, что были обнаружены различия в выборе ТФ между видами, так, например, NeuroD1 и Ngn2 использовались преимущественно в протоколах репрограммирования клеток человека, но не в протоколах для мышиных клеток [79, 81]. Однако,

учитывая небольшое количество ТФ, исследованных с этой точки зрения, неизвестно, действительно ли способность к ремоделированию 5mC ограничена первичными ТФ. Кроме того, механизм ТФ-индуцированной локальной потери 5mC не понятен. Возможно, ТФ могут напрямую задействовать механизм деметилирования цитозина, опосредованный Ten Eleven Translocation метилцитозиндиоксигеназой (TET), или в качестве альтернативы активируют промежуточные этапы ремоделирования хроматина или модификации гистонов [94].

В исследовании Luo et al. [95] авторы попытались показать, какие эпигенетические изменения определяют процесс прямого репрограммирования фибробластов мыши в нейроны. Анализируя репрограммирование ТФ Brn2, Ascl1 и Myt1L вместе и по отдельности, они показали, что Ascl1 или BAM индуцировали значительное глобальное накопление метилирования mCH, которое отсутствовало у фибробластов и на промежуточных стадиях репрограммирования. Причем, видимо, основную роль в накоплении метилирования mCH играл именно ТФ Ascl1, однако остальные два фактора (Brn2 и Myt1L) формировали сигнатуры метилирования зрелых нейронов. При этом Ascl1 также вызывал локальное деметилирование CG в своих сайтах связывания. Сравнив паттерны метилирования в зрелых нейронах коры мыши с паттернами в репрограммированных клетках, они показали, что mCH и там сильно обогащены в контексте mCAC, что показывает формирование возрастных сигнатур метилирования у полученных нейронов по сравнению с изначальными эмбриональными фибробластами. Также они показали, что раннее накопление mCH коррелирует с генами, демонстрирующими динамическую экспрессию во время перепрограммирования, и подтвердили, что высоко экспрессируемые гены накапливают меньше mCH, чем низко экспрессируемые гены, снижающие свою активность в процессе репрограммирования, например гены фибробластов. При этом в процессе развития нативного мозга мыши активация генов с положительной регуляцией развития связана с накоплением hmCG, что может косвенно задействовать DNMT3A и TET для производства hmCG [33].

Прямое превращение из фибробластов в нейроны связано с выраженным промоторным гиперметилированием, которое является уникальным для индуцированных нейронов и дифференцированных из нейральных прогениторных клеток, но не наблюдается во время дифференцировки нейронов *in vivo* [95]. Авторы показали, что индуцированные нейроны проявляют как согласованные (например, mCH), так и различные (например, метилирование промоторов) эпигеномные изменения по сравнению со зрелыми корковыми нейронами. Таким образом, метилирование *de novo* необходимо для прямого репрограммирования. Сохранение возрастной потери нуклеоцитоплазматической компартментализации (NCC) в индуцированных нейронах показали Mertens et al. [96] при прямом репрограммировании фибробластов человека с помощью ТФ Ngn2 и Ascl1, а также малых молекул-ингибиторов передачи сигналов TGFβ /SMAD [аббревиатура состоит из гомологий генов семейства Caenorhabditis elegans SMA («small» worm phenotype) and Drosophila MAD («Mothers Against Decapentaplegic»)], GSK3β (киназа гликоген-синтазы 3 бета) и энхансеров внутриклеточного циклического АМФ.

Кроме ТФ, в прямом репрограммировании используют микроРНК, shRNA (короткая/малая шпилечная РНК) и малые молекулы. Самым успешным, на данный момент, протоколом с РНК можно считать протокол Yoo et al. [97], основанный на трансдукции вектора с микроРНК-9/9* и микроРНК-124. Синергическое воздействие этих микроРНК позволило получить функциональные индуцированные нейроны из фибробластов взрослого человека. При этом исследование Huh et al. [98] показало, что прямое репрограммирование с помощью микроРНК-9/9* и микроРНК-124 никак не меняет возрастные сигнатуры метилирования ДНК. Авторы проверили возможность получения функциональных индуцированных нейронов из фибробластов доноров разного возраста: от 3 дней до 96 лет. На основании эпигенетических часов Horvath они показали, что фактический хронологический возраст доноров сильно коррелировал с предполагаемым возрастом ДНК фибробластов (корреляция = 0,75) и репрограммированных нейронов (корреляция = 0,82). Более того, при сравнении паттернов метилирования ДНК каждого перепрограммированного нейрона с паттернов метилирования ДНК соответствующего фибробласта наблюдалась почти идеальная корреляция (R = 0,91), что свидетельствует о том, что эпигенетические часы не нарушаются во время прямого репрограммирования нейронов на основе микроРНК. Помимо паттернов метилирования, авторы показали, что при прямом репрограммировании сохраняются и все остальные клеточные маркеры старения, такие как повышенный уровень АФК, повреждения ДНК и уменьшающаяся TL. Примечательно, что специфические паттерны метилирования нейронов являются дополнительным фактором идентификации нейронного подтипа.

Более того, эти паттерны способны дать информацию о функциональности полученных нейронов [99, 100].

Таким образом, прямое репрограммирование, сохраняющее эпигенетический статус первичных клеток, гораздо предпочтительнее для моделирования возрастных нейродегенеративных заболеваний.

НЕДОСТАТКИ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ С СОХРАНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Из всего описанного выше выбор прямо репрограммированных клеток для создания моделей нейродегенерации кажется очевидным. Однако есть и минусы в этой методике. Во-первых, протоколы дифференцировки из ИПСК более воспроизводимы [92]. Во-вторых, требования к источникам первичных клеток для прямого репрограммирования более высоки, поскольку не все соматические клетки подходят для успешного нейронального репрограммирования. Проще всего прямое репрограммирование проходит с глиальными клетками, которые довольно сложно получить у взрослого человека. ИПСК возможно получить из любого первичного типа клеток, а из них соответственно – любой конечный тип. В-третьих, недостатком первично репрограммированных клеток является ограниченное количество пассажей. С одной стороны, процесс получения ИПСК и из них – конечного типа клеток дорог и продолжителен. Время генерации стабильных ИПСК-клонов составляет 2–3 месяца, а дальнейшая дифференцировка – 6–15 недель [101]. При прямом репрограммировании желаемую культуру можно получить уже через 2–4 недели, а полностью функциональную нейронную сеть, еще через 5–6 недель, что значительно быстрее, чем при работе с ИПСК [96]. Однако, несмотря на это, стабильные клоны ИПСК пассируются практически без ограничений, так что однажды выведенные, они могут быть использованы множество раз для самых разных задач. Прямо репрограммированные клетки без дополнительных модификаций будут ограничены пределом Хейфлика для своей первоначальной культуры клеток. Тем не менее если стоит задача получения аутологичной культуры клеток для персонализированной терапии или персонализированного моделирования возрастного заболевания, то неограниченность пассажей ИПСК значения не имеет. Предел Хейфлика в прямо репрограммированных клетках для задач *in vitro* можно преодолеть искусственно с помощью вставки экзогенной теломеразы (hTERT), которая не повлияет на эпигенетические паттерны возраста, хотя и таит в себе опасность появления генетических артефактов.

Нельзя не отметить, что в случае изучения врожденных нейродегенеративных заболеваний, ИПСК могут быть не менее или даже более полезны, чем прямо репрограммированные клетки. Ведь они могут смоделировать особенности развития болезни на ранних этапах жизни. А комбинирование обеих методик даст уникальную картину эпигенетического развития болезни в процессе жизни пациента [11]. Например, при исследовании наследственной болезни Гентингтона такой подход позволил показать, что мутантный белок хантингтин самопроизвольно агрегируется в возрастных индуцированных нейронах, но не в молодых нейронах, полученных из ИПСК того же донора [102]. Также использование ИПСК является более предпочтительным для моделирования болезней раннего развития, например заболеваний аутистического спектра. Так, Schafer et al. [103] сравнили дифференцированные нейроны, полученные из ИПСК и напрямую, и только первые показали измененный болезнью фенотип. В противоположность наиболее широко распространенному предположению, что первые патологические фенотипические изменения появляются в незрелых нейронах, они обнаружили гетерохронные изменения генной сети уже на стадии нервных стволовых клеток. Также прямо репрограммированные клетки – культура крайне гетерогенная как по генетическим и фенотипическим показателям, так и по эпигенетическим. И это может быть как преимуществом при моделировании сложного заболевания, где клеточный мозаицизм может играть решающую роль, так и недостатком, например при создании изогенной контрольной линии клеток.

Таким образом, решение при выборе той или иной методики сильно зависит от условий, задачи и желаемого результата. Но, в целом, есть смысл комбинировать их для решения сложных задач.

Прямое репрограммирование является и альтернативой, и ценным дополнением к методике ИПСК для изучения основ клеточной идентичности и функциональности, исследования развития и старения человека и моделирования неврологических заболеваний, а также в качестве новой стратегии для *in vivo* заместительной терапии. В отличие от репрограммирования через стадию плюрипотентности, индуцированные нейроны сохраняют эпигенетический возраст (профиль метилирования ДНК,

размер теломерных концов) первоначальной культуры. Это позволяет создавать более адекватные модели возрастных нейродегенеративных заболеваний, а также изучать влияния старения на развитие других врожденных и приобретенных заболеваний. Основным недостатком прямого репрограммирования является то, что получаемые клетки имеют ограниченные возможности по количеству пассажей, так же как первичные клетки. Оптимизация технологии получения аутологичных клеток пациентов с использованием альтернативных методов прямого и непрямого репрограммирования будет способствовать дальнейшему развитию направлений регенеративной и персонифицированной медицины.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-115-50396).

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. Dong, X., Milholland, B., and Vijg, J. (2016) Evidence for a limit to human lifespan, *Nature*, **538**, 257-259, doi: 10.1038/nature19793.
2. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**,1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
3. Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., and Horvath, S. (2018) An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan, *Aging (Albany NY)*, **10**, 573-591, doi: 10.18632/aging.101414.
4. Levine, M. E., Hosgood, H. D., Chen, B., Absher, D., Assimes, T., and Horvath, S. (2015) DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative, *Aging (Albany NY)*, **7**, 690-700, doi: 10.18632/aging.100809.
5. Horvath, S., and Levine, A. J. (2015) HIV-1 infection iccelerates ige iccording to the epigenetic clock, *J. Infect. Dis.*, **212**, 1563-1573, doi: 10.1093/infdis/jiv277.
6. Jylhävä, J., Pedersen, N. L., and Hägg, S. (2017) Biological age predictors, *EBioMedicine*, **21**, 29-36, doi: 10.1016/ j.ebiom.2017.03.046.
7. Gladyshev, T. V., and Gladyshev, V. N. (2016) A disease or not a disease? Aging as a pathology, *Trends Mol. Med.*, **22**, 995-996, doi: 10.1016/j.molmed.2016.09.009.
8. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861-72, doi: 10.1016/ j.cell.2007.11.019.
9. Mertens, J., Marchetto, M. C., Bardy, C., and Gage, F. H. (2016) Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 424-37, doi: 10.1038/nrn.2016.46.
10. Böhnke, L., Traxler, L., Herdy, J. R., and Mertens, J. (2018) Human neurons to model aging: a dish best served old, *Drug Discov. Today Dis. Models*, **27**, 43-49, doi: 10.1016/j.ddmod.2019.01.001.
11. Traxler, L., Edenhofer, F., and Mertens, J. (2019) Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons, *FEBS Lett.*, **593**, 3316-3337, doi: 10.1002/1873-3468.13678.
12. Mertens, J., Reid, D., Lau, S., Kim, Y., and Gage, F. H. (2018) Aging in a dish: iPSC-derived and directly induced neurons for studying brain aging and age-related neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 271-293, doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031534.
13. Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **37**, 614-636, doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
14. Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Chua, K. F., Mattson, M. P., Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (2016) Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 308-321, doi: 10.1038/nrm.2016.14.
15. Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P., and Leeuwenburgh, C. (2009) Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases, *Ageing Res. Rev.*, **8**, 18-30, doi: 10.1016/j.arr.2008.07.002.
16. Khan, S. S., Singer, B. D., and Vaughan, D. E. (2017) Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans, *Aging cell*, **16**, 624-633, doi: 10.1111/acel.12601.
17. Malaquin, N., Martinez, A., and Rodier, F. (2016) Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype, *Exp. Gerontol.*, **82**, 39-49, doi: 10.1016/j.exger.2016.05.010.
18. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, R115, doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
19. Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., Christensen, B. C., Gladyshev, V. N., Heijmans, B. T., Horvath, S., Ideker, T., Issa, J. J., Kelsey, K. T., Marioni, R. E., Reik, W., Relton, C. L., Schalkwyk, L. C., Teschendorff, A. E., Wagner, W., Zhang, K., and Rakyan, V. K. (2019) DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations, *Genome Biol.*, **20**, 249, doi: 10.1186/s13059-019-1824-y.
20. Johnson, T. E. (2006) Recent results: biomarkers of aging, *Exp. Gerontol.*, **41**, 1243-1246, doi: 10.1016/j.exger.2006.09.006.
21. Butler, R. N., Sprott, R., Warner, H., Bland, J., Feuers, R., Forster, M., Fillit, H., Harman, S. M., Hewitt, M., Hyman, M., Johnson, K., Kligman, E., McClearn, G., Nelson, J., Richardson, A., Sonntag, W., Weindruch, R., and Wolf, N. (2004) Biomarkers of aging: from primitive organisms to humans, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, B560-B567, doi: 10.1093/gerona/59.6.b560.
22. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
23. Palm, W., and de Lange, T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu. Rev. Genet.*, **42**, 301-334, doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.

24. Von Zglinicki, T., and Martin-Ruiz, C. M. (2005) Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases, *Curr. Mol. Med.*, **5**, 197-203, doi: 10.2174/1566524053586545.
25. Mather, K. A., Jorm, A. F., Parslow, R. A., and Christensen, H. (2011) Is telomere length a biomarker of aging? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 202-213, doi: 10.1093/gerona/glq180.
26. Lu, A. T., Seeboth, A., Tsai, P. C., Sun, D., Quach, A., et al. (2019) DNA methylation-based estimator of telomere length, *Aging (Albany NY)*, **11**, 5895-5923, doi: 10.18632/aging.102173.
27. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippin, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., and Ecker, J. R. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature*, **462**, 315-322, doi: 10.1038/nature08514.
28. Stadler, M. B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E. J., Gaidatzis, D., Tiwari, V. K., and Schübeler, D. (2011) DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions, *Nature*, **480**, 490-495, doi: 10.1038/nature10716.
29. Schultz, M. D., He, Y., Whitaker, J. W., Hariharan, M., Mukamel, E. A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J. R., Urich, M. A., Chen, H., Lin, S., Lin, Y., Jung, I., Schmitt, A. D., Selvaraj, S., Ren, B., Sejnowski, T. J., Wang, W., and Ecker, J. R. (2015) Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation, *Nature*, **523**, 212-216, doi: 10.1038/nature14465.
30. Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., and Young, R. A. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes, *Cell*, **153**, 307-319, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.035.
31. He, Y., Hariharan, M., Gorkin, D. U., Dickel, D. E., Luo, C., Castanon, R. G., Nery, J. R., Lee, A. Y., Williams, B. A., Trout, D., Amrhein, H., Fang, R., Chen, H., Li, B., Visel, A., Pennacchio, L. A., Ren, B., and Ecker, J. R. (2017) Spatiotemporal DNA methylome dynamics of the developing mammalian fetus, *bioRxiv*, doi: 10.1101/166744.
32. Woodcock, D. M., Crowther, P. J., and Diver, W. P. (1987) The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 888-894, doi: 10.1016/0006-291x(87)91048-5.
33. Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghighi, F. G., Sejnowski, T. J., Behrens, M. M., and Ecker, J. R. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development, *Science*, **341**, 1237905, doi: 10.1126/science.1237905.
34. Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D. O., and Gibb, R. (2012) Experience and the developing prefrontal cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109 Suppl. 2**, 17186-17193, doi: 10.1073/pnas.1121251109.
35. Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2012) MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system, *Cell*, **151**, 1417-1430, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.022.
36. Li, H., Radford, J. C., Ragusa, M. J., Shea, K. L., McKercher, S. R., Zaremba, J. D., Soussou, W., Nie, Z., Kang, Y. J., Nakanishi, N., Okamoto, S., Roberts, A. J., Schwarz, J. J., and Lipton, S. A. (2008) Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9397-9402, doi: 10.1073/pnas.0802876105.
37. Akhtar, M. W., Kim, M. S., Adachi, M., Morris, M. J., Qi, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., Kavalali, E. T., and Monteggia, L. M. (2012) *In vivo* analysis of MEF2 transcription factors in synapse regulation and neuronal survival, *PLoS One*, **7**, e34863, doi: 10.1371/journal.pone.0034863.
38. Fraga, M. F., and Esteller, M. (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks, *Trends Genet.*, **23**, 413-418, doi: 10.1016/j.tig.2007.05.008.
39. Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., Shen, H., Campan, M., Noushmehr, H., Bell, C. G., Maxwell, A. P., Savage, D. A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Kocjan, G., Gayther, S. A., Jones, A., Beck, S., Wagner, W., Laird, P. W., Jacobs, I. J., and Widschwendter, M. (2010) Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer, *Genome Res.*, **20**, 440-446, doi: 10.1101/gr.103606.109.
40. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sadda, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., and Zhang, K. (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates, *Mol. Cell*, **49**, 359-367, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016.
41. Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., and Adams, P. D. (2018) DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences, *Mol. Cell*, **71**, 882-895, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.008.
42. Sehl, M. E., Henry, J. E., Storniolo, A. M., Ganz, P. A., and Horvath, S. (2017) DNA methylation age is elevated in breast tissue of healthy women, *Breast Cancer Res. Treat.*, **164**, 209-219, doi: 10.1007/s10549-017-4218-4.
43. Binder, A. M., Corvalan, C., Mericq, V., Pereira, A., Santos, J. L., Horvath, S., Shepherd, J., and Michels, K. B. (2018) Faster ticking rate of the epigenetic clock is associated with faster pubertal development in girls, *Epigenetics*, **13**, 85-94, doi: 10.1080/15592294.2017.1414127.
44. Horvath, S., and Raj, K. (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 371-384, doi: 10.1038/s41576-018-0004-3.
45. Lu, A. T., Quach, A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., Assimes, T. L., Ferrucci, L., and Horvath, S. (2019) DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan, *Aging (Albany NY)*, **11**, 303-327, doi: 10.18632/aging.101684.
46. Booth, L. N., and Brunet, A. (2016) The aging epigenome, *Mol. Cell*, **62**, 728-744, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.013.
47. Rose, N. R., and Klose, R. J. (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 1362-1372, doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.02.007.
48. Reddington, J. P., Perricone, S. M., Nestor, C. E., Reichmann, J., Youngson, N. A., Suzuki, M., Reinhardt, D., Dunican, D. S., Prendergast, J. G., Mjoseng, H., Ramsahoye, B. H., Whitelaw, E., Greally, J. M., Adams, I. R., Bickmore, W. A., and Meehan, R. R. (2013) Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in derepression of Polycomb target genes, *Genome Biol.*, **14**, R25, doi: 10.1186/gb-2013-14-3-r25.
49. Berger, S. L., and Sassone-Corsi, P. (2016) Metabolic signaling to chromatin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a019463, doi: 10.1101/cshperspect.a019463.
50. Niccoli, T., and Partridge, L. (2012) Ageing as a risk factor for disease, *Curr. Biol.*, **22**, R741-52, doi: 10.1016/j.cub.2012.07.024.

51. Ahlfors, J. E., Azimi, A., El-Ayoubi, R., Velumian, A., Vonderwalde, I., Boscher, C., Mihai, O., Mani, S., Samoilova, M., Khazaei, M., Fehlings, M. G., and Morshead, C. M. (2019) Examining the fundamental biology of a novel population of directly reprogrammed human neural precursor cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 166, doi: 10.1186/s13287-019-1255-4.
52. Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., and Mummery, C. L. (2012) Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 713-726, doi: 10.1038/nrm3448.
53. Lancaster, M. A., and Knoblich, J. A. (2014) Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies, *Science*, **345**, 1247125, doi: 10.1126/science.1247125.
54. Götz, M., Nakafuku, M., and Petrik, D. (2016) Neurogenesis in the developing and adult brain – similarities and key differences, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a018853, doi: 10.1101/cshperspect.a018853.
55. Scheffler, B., Walton, N. M., Lin, D. D., Goetz, A. K., Enikolopov, G., Roper, S. N., and Steindler, D. A. (2005) Phenotypic and functional characterization of adult brain neuropoiesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9353-9358, doi: 10.1073/pnas.0503965102.
56. Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C., Stott, R. T., Gjoneska, E., Nott, A., Cho, S., Kellis, M., and Tsai, L. H. (2015) Activity-induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes, *Cell*, **161**, 1592-1605, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.032.
57. D'Angelo, M. A., Raices, M., Panowski, S. H., and Hetzer, M. W. (2009) Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells, *Cell*, **13**, 284-295, doi: 10.1016/j.cell.2008.11.037.
58. Marchetto, M. C., Brennand, K. J., Boyer, L. F., and Gage, F. H. (2011) Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, R109-R115, doi: 10.1093/hmg/ddr336.
59. Lafaille, F. G., Pessach, I. M., Zhang, S. Y., Ciancanelli, M. J., Herman, M., Abhyankar, A., Ying, S. W., Keros, S., Goldstein, P. A., Mostoslavsky, G., Ordovas-Montanes, J., Jouanguy, E., Plancoulaine, S., Tu, E., Elkabetz, Y., Al-Muhsen, S., Tardieu, M., Schlaeger, T. M., Daley, G. Q., Abel, L., Casanova, J. L., Studer, L., and Notarangelo, L. D. (2012) Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells, *Nature*, **491**, 769-773, doi: 10.1038/nature11583.
60. Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., and Studer, L. (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs, *Nature*, **461**, 402-406, doi: 10.1038/nature08320.
61. De Boni, L., Gasparoni, G., Haubenreich, C., Tierling, S., Schmitt, I., Peitz, M., Koch, P., Walter, J., Wüllner, U., and Brüstle, O. (2018) DNA methylation alterations in iPSC- and hESC-derived neurons: potential implications for neurological disease modeling, *Clin. Epigenetics*, **10**, 13, doi: 10.1186/s13148-018-0440-0.
62. Rando, T. A., and Chang, H. Y. (2012) Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock, *Cell*, **148**, 46-57, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.003.
63. Olova, N., Simpson, D. J., Marioni, R. E., and Chandra, T. (2019) Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity, *Aging Cell*, **18**, e12877, doi: 10.1111/acel.12877.
64. Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J. L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nuñez, G., Delicado, E. N., Campistol, J. M., Guillen, I., and Belmonte, J. C. I. (2016) *In vivo* amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming, *Cell*, **167**, 1719-1733.e12, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.052.
65. Sheng, C., Jungverdorben, J., Wiethoff, H., Lin, Q., Flitsch, L. J., Eckert, D., Hebisch, M., Fischer, J., Kesavan, J., Weykopf, B., Schneider, L., Holtkamp, D., Beck, H., Till, A., Wüllner, U., Ziller, M. J., Wagner, W., Peitz, M., and Brüstle, O. (2018) A stably self-renewing adult blood-derived induced neural stem cell exhibiting patternability and epigenetic rejuvenation, *Nat. Commun.*, **9**, 4047, doi: 10.1038/s41467-018-06398-5.
66. Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M. A. (2009) Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **4**, 141-154, doi: 10.1016/j.stem.2008.12.010.
67. Suhr, S. T., Chang, E. A., Rodriguez, R. M., Wang, K., Ross, P. J., Beyhan, Z., Murthy, S., and Cibelli, J. B. (2009) Telomere dynamics in human cells reprogrammed to pluripotency, *PLoS One*, **4**, e8124, doi: 10.1371/journal.pone.0008124.
68. Suhr, S. T., Chang, E. A., Tjong, J., Alcasid, N., Perkins, G. A., Goissis, M. D., Ellisman, M. H., Perez, G. I., and Cibelli, J. B. (2010) Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency, *PLoS One*, **5**, e14095, doi: 10.1371/journal.pone.0014095.
69. Prigione, A., Hossini, A. M., Lichtner, B., Serin, A., Fauler, B., Megges, M., Lurz, R., Lehrach, H., Makrantonaki, E., Zouboulis, C. C., and Adjaye, J. (2011) Mitochondrial-associated cell death mechanisms are reset to an embryonic-like state in aged donor-derived iPS cells harboring chromosomal aberrations, *PLoS One*, **6**, e27352, doi: 10.1371/journal.pone.0027352.
70. Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., Chestkov, I. V., Semashko, T. A., Kiseleva, E., Suldina, L. A., Bobrovsky, P. A., Zimina, O. A., Ryazantseva, M. A., Skopin, A. Y., Illarioshkin, S. N., Kaznacheyeva, E. V., Lagarkova, M. A., and Kiselev, S. L. (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Mol. Neurodegener.*, **11**, 27, doi: 10.1186/s13024-016-0092-5.
71. Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T., Hoffmann, P., Klockgether, T., Evert, B. O., Wüllner, U., and Brüstle, O. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado–Joseph disease, *Nature*, **480**, 543-546, doi: 10.1038/nature10671.
72. Duan, L., Bhattacharyya, B. J., Belmadani, A., Pan, L., Miller, R. J., and Kessler, J. A. (2014) Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death, *Mol. Neurodegener.*, **9**, 3, doi: 10.1186/1750-1326-9-3.
73. Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., and Suzuki, N. (2011) Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4530-4539, doi: 10.1093/hmg/ddr394.
74. Miller, J. D., Ganat, Y. M., Kishinevsky, S., Bowman, R. L., Liu, B., Tu, E. Y., Mandal, P. K., Vera, E., Shim, J. W., Kriks, S., Taldone, T., Fusaki, N., Tomishima, M. J., Krainc, D., Milner, T. A., Rossi, D. J., and Studer, L. (2013) Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging, *Cell Stem Cell*, **13**, 691-705, doi: 10.1016/j.stem.2013.11.006.

75. Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts, *Cell*, **51**, 987-1000, doi: 10.1016/0092-8674(87)90585-x.
76. Huang, P., Zhang, L., Gao, Y., He, Z., Yao, D., Wu, Z., Cen, J., Chen, X., Liu, C., Hu, Y., Lai, D., Hu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Cheng, X., Ma, X., Pan, G., Wang, X., and Hui, L. (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes, *Cell Stem Cell*, **14**, 370-384, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.003.
77. Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., and Srivastava, D. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors, *Cell*, **142**, 375-386, doi: 10.1016/j.cell.2010.07.002.
78. Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006) Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors, *Immunity*, **25**, 731-744, doi: 10.1016/j.immuni.2006.09.011.
79. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors, *Nature*, **463**, 1035-1041, doi: 10.1038/nature08797.
80. Zhu, S., Russ, H. A., Wang, X., Zhang, M., Ma, T., Xu, T., Tang, S., Hebrok, M., and Ding, S. (2016) Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts, *Nat. Commun.*, **7**, 10080, doi: 10.1038/ncomms10080.
81. Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhofm, T. C., and Wernig, M. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors, *Nature*, **476**, 220-223, doi: 10.1038/nature10202.
82. Mollinari, C., Zhao, J., Lupacchini, L., Garaci, E., Merlo, D., and Pei, G. (2018) Transdifferentiation: a new promise for neurodegenerative diseases, *Cell Death Dis.*, **9**, 830, doi: 10.1038/s41419-018-0891-4.
83. Wapinski, O. L., Vierbuchen, T., Qu, K., Lee, Q. Y., Chanda, S., Fuentes, D. R., Giresi, P. G., Ng, Y. H., Marro, S., Neff, N. F., Drechsel, D., Martynoga, B., Castro, D. S., Webb, A. E., Südhof, T. C., Brunet, A., Guillemot, F., Chang, H. Y., and Wernig, M. (2013) Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons, *Cell*, **155**, 621-635, doi: 10.1016/j.cell.2013.09.028.
84. Chronis, C., Fiziev, P., Papp, B., Butz, S., Bonora, G., Sabri, S., Ernst, J., and Plath, K. (2017) Cooperative binding of transcription factors orchestrates reprogramming, *Cell*, **168**, 442-459.e20, doi: 10.1016/j.cell.2016.12.016.
85. Fu, K., Chronis, C., Soufi, A., Bonora, G., Edwards, M., Smale, S. T., Zaret, K. S., Plath, K., and Pellegrini, M. (2018) Comparison of reprogramming factor targets reveals both species-specific and conserved mechanisms in early iPSC reprogramming, *BMC Genomics*, **19**, 956, doi: 10.1186/s12864-018-5326-1.
86. Liu, M. L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J. C., Gibson, J. R., Huber, K. M., and Zhang, C. L. (2013) Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons, *Nat. Commun.*, **4**, 2183, doi: 10.1038/ncomms3183.
87. Matsuda, T., Irie, T., Katsurabayashi, S., Hayashi, Y., Nagai, T., Hamazaki, N., Adefuin, A. M. D., Miura, F., Ito, T., Kimura, H., Shirahige, K., Takeda, T., Iwasaki, K., Imamura, T., and Nakashima, K. (2019) Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia–neuron conversion, *Neuron*, **101**, 472-485.e7, doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.010.
88. Iwafuchi-Doi, M., and Zaret, K. S. (2014) Pioneer transcription factors in cell reprogramming, *Genes Dev.*, **28**, 2679-2692, doi: 10.1101/gad.253443.114.
89. Wapinski, O. L., Lee, Q. Y., Chen, A. C., Li, R., Corces, M. R., Ang, C. E., Treutlein, B., Xiang, C., Baubet, V., Suchy, F. P., Sankar, V., Sim, S., Quake, S. R., Dahmane, N., Wernig, M., and Chang, H. Y. (2017) Rapid chromatin switch in the direct reprogramming of fibroblasts to neurons, *Cell Rep.*, **20**, 3236-3247, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.011.
90. Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F.-J., Koch, P., and Brüstle, O. (2012) Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts, *Nat. Methods*, **9**, 575-78, doi: 10.1038/nmeth.1972.
91. Zhao, J., He, H., Zhou, K., Ren, Y., Shi, Z., Wu, Z., Wang, Y., Lu, Y., and Jiao, J. (2012) Neuronal transcription factors induce conversion of human glioma cells to neurons and inhibit tumorigenesis, *PLoS One*, **7**, e41506, doi: 10.1371/journal.pone.0041506.
92. Samoilova, E. M., Kalsin, V. A., Kushnir, N. M., Chistyakov, D. A., Troitskiy, A. V., and Baklaushev, V. P. (2018) Adult neural stem cells: basic research and production strategies for neurorestorative therapy, *Stem Cells Int.*, **2018**, 4835491, doi: 10.1155/2018/4835491.
93. Samoilova, E. M., Revkova, V. A., Brovkina, O. I., Kalsin, V. A., Melnikov, P. A., Konoplyannikov, M. A., Galimov, K. R., Nikitin, A. G., Troitskiy, A. V., and Baklaushev, V. P. (2019) Chemical reprogramming of somatic cells in neural direction: myth or reality? *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 546-555, doi: 10.1007/s10517-019-04570-5.
94. Wu, H., and Zhang, Y. (2014) Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions, *Cell*, **156**, 45-68, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.019.
95. Luo, C., Lee, Q. Y., Wapinski, O., Castanon, R., Nery, J. R., Mall, M., Kareta, M. S., Cullen, S. M., Goodell, M. A., Chang, H. Y., Wernig, M., and Ecker, J. R. (2019) Global DNA methylation remodeling during direct reprogramming of fibroblasts to neurons, *eLife*, **8**, e40197, doi: 10.7554/eLife.40197.
96. Mertens, J., Paquola, A., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J. R., Gonçalves, J. T., Toda, T., Kim, Y., Winkler, J., Yao, J., Hetzer, M. W., and Gage, F. H. (2015) Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects, *Cell Stem Cell*, **17**, 705-718, doi: 10.1016/j.stem.2015.09.001.
97. Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R. E., Tsien, R. W., and Crabtree, G. R. (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons, *Nature*, **476**, 228-231, doi: 10.1038/nature10323.
98. Huh, C. J., Zhang, B., Victor, M. B., Dahiya, S., Batista, L. F., Horvath, S., and Yoo, A. S. (2016) Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts, *eLife*, ***5***, e18648, doi: 10.7554/eLife.18648.
99. Stroud, H., Su, S. C., Hrvatin, S., Greben, A. W., Renthal, W., Boxer, L. D., Nagy, M. A., Hochbaum, D. R., Kinde, B., Gabel, H. W., and Greenberg, M. E. (2017) Early-life gene expression in neurons modulates lasting epigenetic states, *Cell*, **171**, 1151-1164.e16, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.047.
100. Iwamoto, K., Bundo, M., Ueda, J., Oldham, M. C., Ukai, W., Hashimoto, E., Saito, T., Geschwind, D. H., and Kato, T. (2011) Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons, *Genome Res.*, **21**, 688-696, doi: 10.1101/gr.112755.110.

101. Nicholas, C. R., Chen, J., Tang, Y., Southwell, D. G., Chalmers, N., Vogt, D., Arnold, C. M., Chen, Y. J., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Sasai, Y., Alvarez-Buylla, A., Rubenstein, J. L., and Kriegstein, A. R. (2013) Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development, *Cell Stem Cell*, **12**, 573-586, doi: 10.1016/j.stem.2013.04.005.
102. Victor, M. B., Richner, M., Olsen, H. E., Lee, S. W., Monteys, A. M., Ma, C., Huh, C. J., Zhang, B., Davidson, B. L., Yang, X. W., and Yoo, A. S. (2018) Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes, *Nat. Neurosci.*, **21**, 341-352, doi: 10.1038/s41593-018-0075-7.
103. Schafer, S. T., Paquola, A., Stern, S., Gosselin, D., Ku, M., Pena, M., Kuret, T., Liyanage, M., Mansour, A. A., Jaeger, B. N., Marchetto, M. C., Glass, C. K., Mertens, J., and Gage, F. H. (2019) Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons, *Nat. Neurosci.*, **22**, 243-255, doi: 10.1038/s41593-018-0295-x.

CELL REPROGRAMMING WITH CONSERVATION OF EPIGENETIC AGE: ADVANTAGE OR LIMITATION?

Review

E. M. Samoilova* and V. P. Baklaushev

Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, FMBA of Russia, 115682 Moscow, Russia; E-mail: samoyket@gmail.com

Received July 28, 2020
Revised July 28, 2020
Accepted August 5, 2020

Our understanding of cell aging advanced significantly since the discovery of this phenomenon by Hayflick and Moorhead in 1961. In addition to the well-known shortening of telomeric regions of chromosomes, cell aging is closely associated with changes of the DNA methylation profile. Establishing, maintaining, or reversing epigenetic age of a cell is central to the technology of cell reprogramming. Two distinct approaches – iPSC- and transdifferentiation-based cell reprogramming – affect differently epigenetic age of the cells. The iPSC-based reprogramming protocols are generally believed to result in the reversion of DNA methylation profiles towards less differentiated states, while the original methylation profiles are preserved in the direct trans-differentiation protocols. Clearly, in order to develop adequate model of CNS pathologies, one has to have thorough understanding of the biological roles of DNA methylation in the development, maintenance of functional activity, tissue and cell diversity, restructuring of neural networks during learning, as well as in aging-associated neuronal decline. Direct cell reprogramming is an excellent alternative and a valuable supplement to the iPSC-based technologies both as a source of mature cells for modeling of neurodegenerative diseases, and as a novel powerful strategy for *in vivo* cell replacement therapy. Further advancement of the regenerative and personalized medicine will strongly depend on optimization of the production of patient-specific autologous cells involving alternative approaches of direct and indirect cell reprogramming that take into account epigenetic age of the starting cell material.

Keywords: regenerative medicine, epigenetic clock, direct cell reprogramming, induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, telomeres, methylome

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1256 – 1273

УДК 612.015.1:579.8

ЛИПОКСИГЕНАЗЫ БАКТЕРИЙ И ПРОСТЕЙШИХ МОГУТ УЧАСТВОВАТЬ В МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ПОДАВЛЕНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА*

© 2020 Г.Ф. Куракин[1], А.М. Самоукина[2], Н.А. Потапова[3,4]**

[1] *Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, 170100 Тверь, Россия; электронная почта: kurackin-georgy@yandex.ru*

[2] *Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, 170100 Тверь, Россия; электронная почта: anna_samoukina@mail.ru*

[3] *Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия; электронная почта: nadezhdalpotapova@gmail.com*

[4] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 19.06.2020
После доработки 22.07.2020
Принята к публикации 22.07.2020

Липоксигеназы распространены в организмах животных, растений и грибов, где вовлечены в широкий круг процессов межклеточной сигнализации. Ранее было установлено присутствие липоксигеназ у ряда бактерий и простейших, но их биологическое значение остаётся неясным. Также было выдвинуто несколько не имеющих экспериментального подтверждения гипотез об их функции. Целью нашей работы стал эволюционный и таксономический анализ бактериальных и протозойных липоксигеназ для оценки их функции с применением биоинформатических методов. Мы выполнили поиск последовательностей липоксигеназ с использованием BLAST, построили филогенетические деревья и сети и проанализировали полученные данные. Наши результаты поддерживают гипотезу об участии липоксигеназ в образовании многоклеточных структур у микроорганизмов и их возможном эволюционном значении в происхождении многоклеточности. Помимо этого, мы нашли подтверждение связи липоксигеназ с подавлением иммунного ответа хозяина паразитическими и симбиотическими бактериями, в том числе опасными оппортунистическими патогенами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липоксигеназы, бактерии, простейшие, биоинформатика, филогенетика, сигнализация, многоклеточность, оппортунистические патогены.

DOI: 10.31857/S0320972520090067

ВВЕДЕНИЕ

Липоксигеназы – это ферменты, катализующие окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с образованием гидропероксидов [1]. Они представлены семейством белков с консервативной среди эукариот структурой. В их активном сайте содержится негемовое железо или редко марганец [2]. Липоксигеназы широко распространены у животных, растений и грибов [3, 4], выполняя идентичную функцию: синтезируемые ими окисленные производные ПНЖК, оксилипины, являются биологически активными веществами.

Основным субстратом липоксигеназ позвоночных является арахидоновая кислота. Их продукты – лейкотриены, гидрокси- и оксоэйкозатетраеновые кислоты и липоксины – регулируют воспалительную реакцию, а также апоптоз клеток, функцию тромбоцитов и развитие опухоли [4–8].

Продукты липоксигеназной реакции у растений также участвуют в ответе на повреждение и атаку патогенными микроорганизмами [9–11]. Наиболее известными являются жасмонаты – циклические оксилипины, структурно напоминающие простагландины животных и обладающие выраженной гормональной активностью [10].

Помимо высших растений, липоксигеназы присутствуют у водорослей и мхов. Предполагается, что у бурых водорослей по липоксигеназному пути синтезируются феромоны, осущест-

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-168, 03.09.2020.

** Адресат для корреспонденции.

вляющие химическую аттракцию между мужской и женской гаметами [12]. У мхов липоксигеназный путь, по всей видимости, необходим для нормального развития [13].

Наиболее интересной особенностью липоксигеназного пути грибов является присутствие марганцевых липоксигеназ (MnLOX), содержащих в активном центре вместо иона железа ион марганца. Предполагается их функция как фактора инвазии, а также в обеспечении чувства кворума и смены формы у диморфных грибов [12].

Таким образом, у многоклеточных организмов липоксигеназы вовлечены преимущественно в процессы межклеточной коммуникации, а также в процесс антимикробной защиты и микробной агрессии.

В связи с этим важным представляется факт наличия липоксигеназ у ряда бактерий и простейших. Методами молекулярной генетики и биоинформатики было установлено присутствие липоксигеназ в 0,5% секвенированных геномов бактерий (по состоянию на 2015 г.) [14]. Лишь немногие из этих ферментов изучены *in vitro*: липоксигеназы двух цианобактерий рода *Nostoc* [15, 16], одной цианобактерии рода *Anabaena* [17], миксобактерии *Myxococcus xanthus* [18] и псевдомонады *Pseudomonas aeruginosa* [19, 20]. Из числа простейших последовательность липоксигеназы описана только у слизевика *Dictyostelium discoideum* [3]. При этом на сегодняшний день функции бактериальных и протозойных липоксигеназ остаются малоизученными [2, 14, 21].

Наибольший объём данных по распространённости липоксигеназ у бактерий суммирован в обзоре Horn et al. [14], однако не проведено детализированного исследования связи их наличия с экофизиологией соответствующих организмов. В указанном обзоре отмечена высокая встречаемость липоксигеназ у нитрифицирующих бактерий и выдвинуто предположение об их связи с метаболизмом азота [14, 22]. Упомянута также высокая распространённость липоксигеназ у цианобактерий и сделана попытка эволюционно связать этот факт с «Кислородной катастрофой» (Great Oxidation Event), вызванной их активностью [14]. Однако биохимические механизмы такой связи остаются не вполне ясными.

Больше всего функциональных данных накоплено по липоксигеназе опасного опортунистического и нозокомиального патогена – синегнойной палочки (*P. aeruginosa*). Её фермент, вероятно, действует как фактор патогенности. Было обнаружено, что он способен синтезировать из жирных кислот организма-хозяина липоксины с противовоспалительным и локальным иммуносупрессивным действием. На основании этого предполагается, что *P. aeruginosa* использует липоксигеназу для подавления иммунитета хозяина [19, 20]. В последнее время также появились данные, что другой изофермент её липоксигеназы запускает ферроптоз бронхиального эпителия, расщепляя фосфолипиды клетки-хозяина [23].

При этом Horn et al. особо отмечают, что у большинства бактерий, патогенных для человека, липоксигеназы не обнаружены. В частности, отмечается их отсутствие у стафилококков, стрептококков, микобактерий туберкулёза и лепры, холерного вибриона, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae* [14]. Авторы делают вывод, что для реализации патогенности у этих бактерий липоксигеназы не являются необходимыми [14].

В работе Goloshchapova et al. [24] наиболее полно суммированы существующие гипотезы о функции бактериальных липоксигеназ:

а) межклеточная сигнализация – такая функция постулируется для *P. aeruginosa* и предполагается для миксобактерий, демонстрирующих сложные социальные паттерны поведения;

б) инвазивный рост и разрушение клеточных мембран патогеном – такой механизм предполагается для *P. aeruginosa*;

в) уклонение от иммунного ответа – такая стратегия обсуждалась выше на примере *P. aeruginosa*;

г) липоксигеназа как сенсор кислорода – такая функция предполагается для липоксигеназы *P. aeruginosa* на основе её низкой аффинности к кислороду;

д) детоксикация ПНЖК, опасных для многих бактерий.

Однако в упомянутой работе не приводятся экспериментальные данные в поддержку той или иной гипотезы.

Оптимальным решением в условиях недостатка экспериментальных данных является филогенетическое и таксономическое профилирование бактериальных и протозойных липоксигеназ и сравнение полученных профилей с литературными данными об экофизиологии соответствующих организмов. Однако на сегодняшний день объём таких работ недостаточен.

В обзоре Horn et al. [14] приводится только таксономический профиль на уровне типа, что не позволяет найти ассоциации с экофизиологией. Hansen et al. [25] провели филогенетическое профилирование бактериальных липоксигеназ, однако они сравнивали свои результаты с биохимическими, а с не экофизиологическими данными.

Целью нашей работы стало установление связи филогенетического и таксономического распределения липоксигеназ бактерий и простейших с их экофизиологическими особенностями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск вероятных последовательностей липоксигеназ проводился с помощью программы BLAST [26] в базах UniProt (https://www.uniprot.org/blast/) [27] и NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Мы использовали две базы для снижения вероятности ложноотрицательного результата. Основной поиск среди бактерий проводили в базе данных UniProt, уточняющий поиск – в NCBI. Для эукариот основной поиск проводили в NCBI, уточняющий – в UniProt. Использование различных баз для бактерий и простейших связано с тем, что BLAST UniProt более оптимальна для визуального контроля большого количества выравниваний (более 500 – для бактерий), в то время как NCBI оптимальна для прицельного поиска среди относительно небольшого числа последовательностей (что имело место для простейших).

В качестве запросов использовали последовательности липоксигеназ из базы данных Swiss-Prot, максимально удалённые филогенетически: арахидонат-12-липоксигеназа человека (UniProt ID: P18054) [28], марганцевая липоксигеназа гриба *Gaeumannomyces graminis* (UniProt ID: Q8X151) [29] и линолеат-9/13-липоксигеназа бактерии *P. aeruginosa* (UniProt ID: Q8RNT4) [30].

Функциональная активность обнаруженных белков была определена косвенным методом по наличию консервативного липоксигеназного домена, которое проверялось с помощью онлайн-сервиса Batch-CD-Search [31] с использованием базы данных CDD [32] и пороговой величины E 0,01. При сомнительном результате BLAST (значение E близко к единице) также вручную проверяли наличие консервативных металлсвязывающих остатков.

На дальнейших этапах анализа использовали только последовательности, имеющие в своей структуре липоксигеназный домен и консервативные металлсвязывающие остатки. Их наличие позволяет с высокой вероятностью предполагать функциональную активность этих белков, поэтому в дальнейшем они будут упоминаться как липоксигеназы и считаться таковыми.

С целью таксономического анализа распространённости липоксигеназ рассчитывали скорректированный показатель встречаемости для каждого порядка.

$$\text{Встречаемость} = (\text{Число родов с липоксигеназами}/\text{Число предсказанных протеомов}) \times 100$$

Количество предсказанных протеомов оценивали по базе данных UniProt, учитывали только невырожденные протеомы. Такая формула нивелирует влияние различий в количестве доступных геномов/протеомов.

Множественные выравнивания строили с помощью доступной онлайн программы MAFFT v. 7 (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/) [33, 34] по алгоритму с итеративным уточнением FFT-NS-i [35], последовательности с большим количеством инсерций и делеций удаляли интегрированным с MAFFT v. 7 сервером MaxAlign [36]. Филогенетические деревья строили в программах MAFFT методом объединения соседей и MEGA [37] – методом минимальной эволюции. В обоих случаях использовали консервативные сайты и Пуассоновскую модель замен. Для тестирования узлов дерева использовали бутстрэп-метод с 500 повторениями. Визуализация и анализ филогенетических деревьев проводили в доступной онлайн среде iTOL (https://itol.embl.de/) [38].

В дополнение к деревьям мы строили и изучали филогенетические сети. Для их построения и визуализации использовали программу SplitsTree [39]. Деревья и сети строили как для всего набора обнаруженных липоксигеназ, так и выборочно для некоторых групп с целью более детального анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическое распределение липоксигеназ поддерживает гипотезу об их связи с межклеточной сигнализацией. Таксономическое распределение липоксигеназ на уровне типов, в целом, соответствовало работе Horn et al. [14]. Однако мы провели более детальный анализ на уровне порядков. Липоксигеназы оказались наиболее распространены у представителей порядков Oscillatoriales (20,93), Myxococcales (16,87) и Nostocales (14,29) (рис. 1). Порядки Oscillatoriales и Nostocales объединяют цианобактерии с нитчатой морфологией, Myxococcales – бактерии, образующие плодовые тела. Среди цианобактерий липоксигеназы таксономически распределены следующим образом: Oscillatoriales (20,93) > Nostocales (14,29) > Synechococcales (6,67) > Chroococcales (4,49), т.е. более представ-

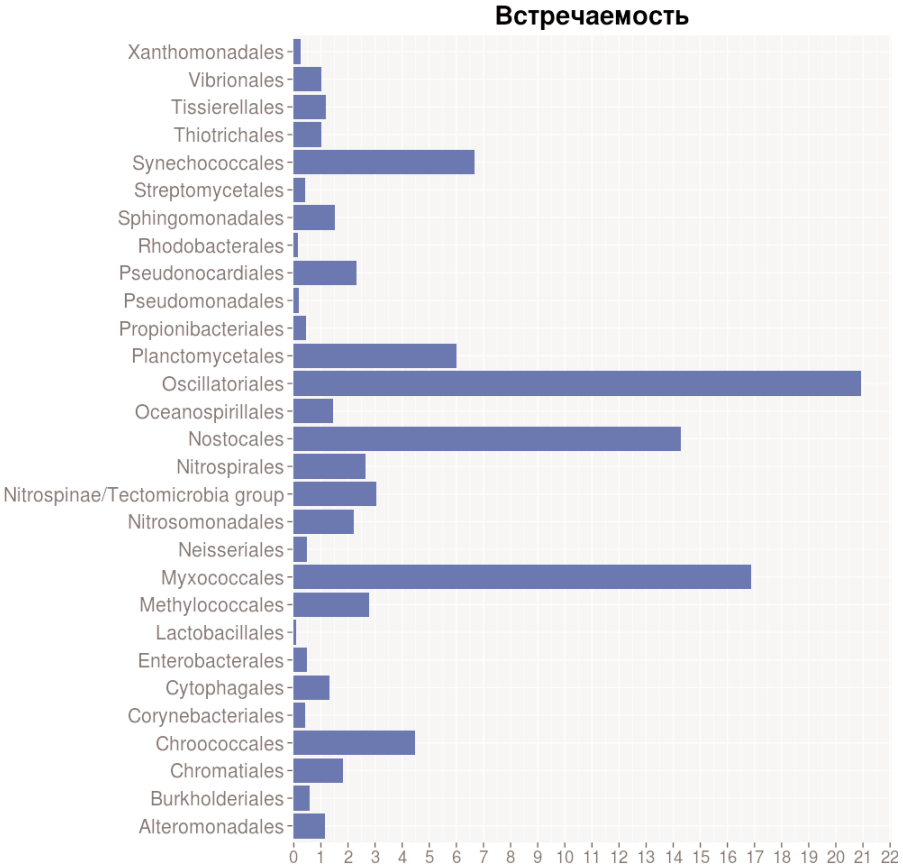


Рис. 1. Встречаемость липоксигеназ в различных порядках бактерий. Изображение получено с использованием R Studio (версия 1.2.1335)

лены у многоклеточных цианобактерий, чем у одноклеточных. Это приводит к предположению, что у бактерий липоксигеназы ассоциированы с образованием многоклеточных структур.

Для простейших расчёт встречаемости с поправкой на протеомы затруднителен из-за малого количества доступных данных. По нескорректированному показателю липоксигеназы наиболее распространены в таксонах Oomycota (12 видов и 5 родов) и Mycetozoa (7 видов и 6 родов) (рис. 2). Для первого характерно образование грибоподобных мицелиальных форм, представители второго иначе называются слизевиками и образуют многоклеточные структуры истинных плазмодиев или псевдоплазмодиев и плодовых тел. В остальных группах простейших липоксигеназы присутствуют у 1–2 видов. Такая картина также согласуется с предположением о связи липоксигеназ и многоклеточности. Дополнительную информацию представил филогенетический анализ.

Филогенетический анализ показывает тесную эволюционную связь липоксигеназ и многоклеточности. На филогенетических деревьях и в филогенетической сети липоксигеназы цианобакте-

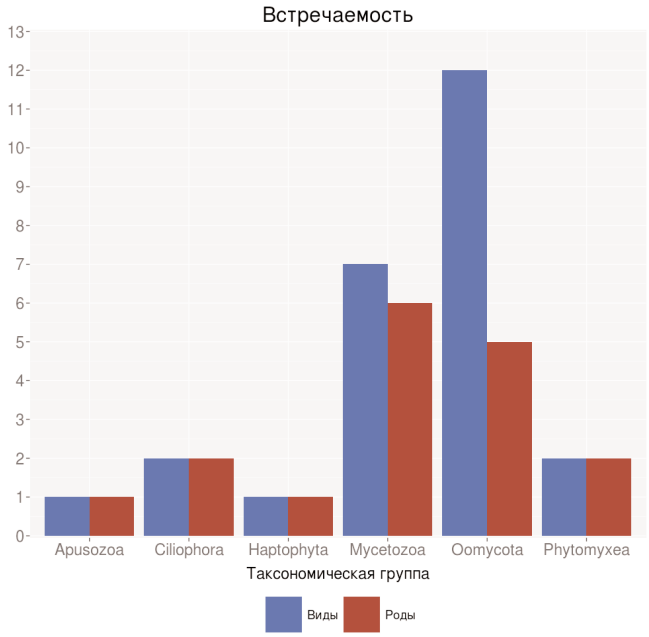


Рис. 2. Распространённость липоксигеназ у простейших (показатели не скорректированы на число доступных протеомов). Изображение получено с использованием R Studio (версия 1.2.1335)

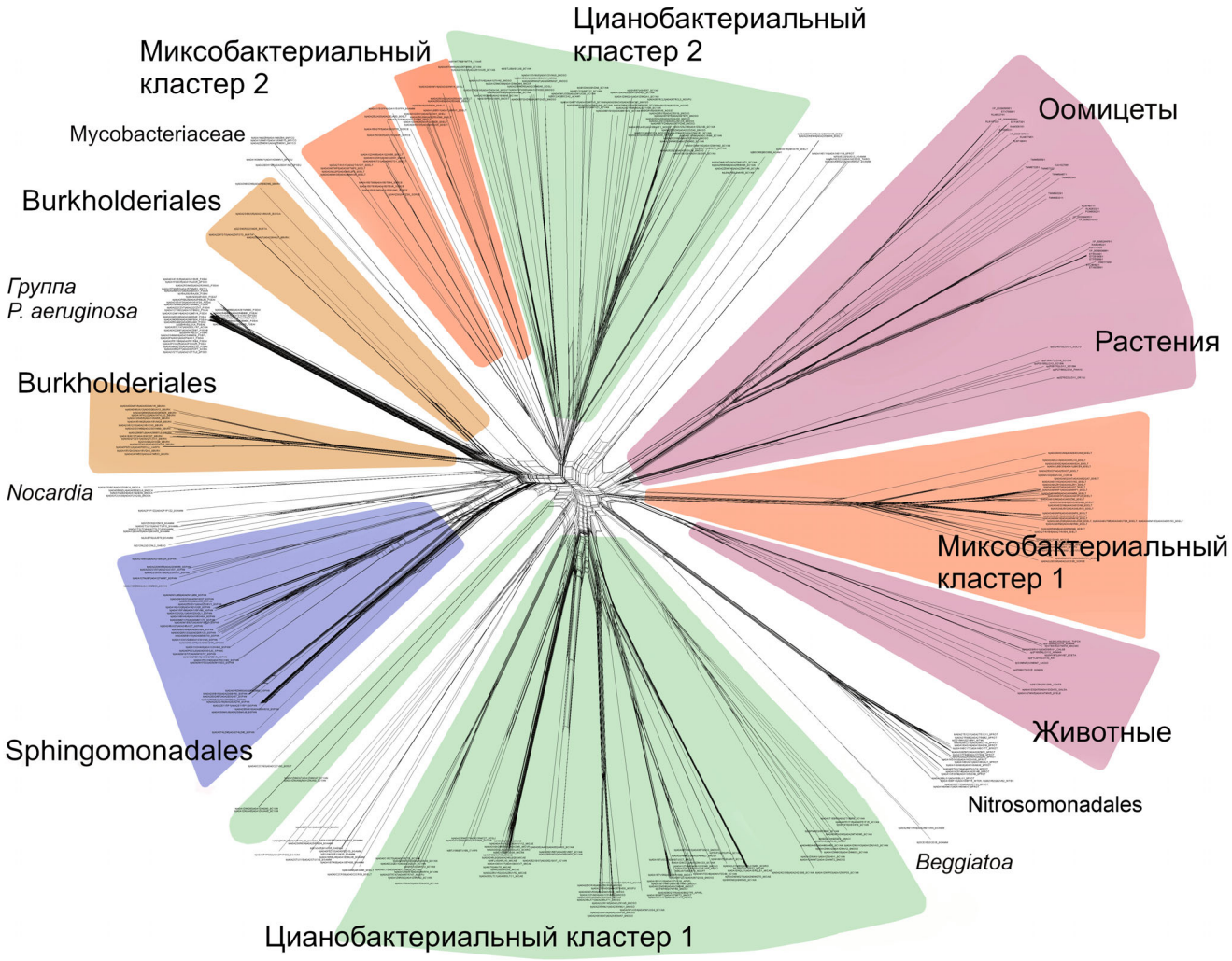


Рис. 3. Филогенетическая сеть для всех проанализированных липоксигеназ. Изображение построено с использованием программы SplitsTree [39]

рий образуют два крупных обособленных кластера, на рисунках обозначенные как «цианобактериальный кластер 1» и «цианобактериальный кластер 2». Наиболее чётко они прослеживаются в филогенетической сети (рис. 3) и в деревьях, построенных методом минимальной эволюции (рис. 4). Обнаружение их разными методами делает вероятной их монофилию, несмотря на довольно низкую бутстрэп-поддержку (не более 59). Кроме того, таксономическая структура кластеров в значительной степени перекрывается, а приблизительно 15–20% видов и штаммов в обоих из них совпадает. Такая ситуация может наблюдаться, если кластеры происходят из одного общего предка, изначально обладавшего двумя изоферментами липоксигеназы.

Остальные таксономические группы – как бактериальные, так и эукариотические – представлены на деревьях и в филогенетической сети только одним кластером или отдельными ветвями, причём все эти ответвления тяготеют к одному из двух цианобактериальных кластеров. Сегмент дерева между кластерами резко обеднен отходящими ветвями, а в консенсусном дереве вообще их не имеет. Это приводит к предположению, что липоксигеназы впервые возникли у цианобактерий и впоследствии (уже после дупликации гена липоксигеназы у их общего предка) были заимствованы остальными группами путём горизонтального переноса. В филогенетической сети отражением этого процесса является отхождение обоих кластеров цианобактерий из центра сети, в то время как остальные группы большей частью объединены в два сетеобразных кластера на периферии центрального узла.

Наличие двух цианобактериальных кластеров является основным отличием наших резуль-

татов от результатов Hansen et al. [25]. В построенных ими деревьях фигурирует только один кластер цианобактерий, по разные стороны от которого располагаются две большие группы протеобактерий, в то время как в построенных нами деревьях и сетях присутствуют два кластера цианобактерий. Это можно объяснить меньшим количеством исследованных цианобактериальных последовательностей у Hansen et al. (29 против >500 – в нашем исследовании) [25], что либо не позволило обнаружить второй кластер, либо привело к группировке всех цианобактериальных липоксигеназ в один кластер.

Тем не менее в наших деревьях аналогично можно выделить две группы протеобактериальных липоксигеназ, располагающихся по разные стороны от цианобактериальных кластеров. Каждая из протеобактериальных групп тяготеет к одному из цианобактериальных кластеров.

Липоксигеназы миксобактерий также формируют два кластера (по одному в каждой протеобактериальной группе). Первый из них (миксобактериальный кластер 1) имеет монофилетический характер с бутстрэп-поддержкой 100 и включает в себя максимальное количество родов, тем самым являясь вероятным кандидатом на происхождение от общего предка миксобактерий. Следует отметить, что в деревьях он представлен длинной ветвью, а в сети практически равноудалён от обоих цианобактериальных кластеров, т.е. дистанция между ним и цианобактериями велика.

Миксобактериальный кластер 2 не имеет единого предкового узла и состоит, как минимум, из двух групп общего происхождения, отходящих от ствола цианобактериального кластера 2. В некоторых деревьях он разбивается на большее количество стволов. В филогенетической сети он обособлен и тесно соседствует с цианобактериальным кластером 2, однако это говорит лишь о филогенетической близости этих двух кластеров.

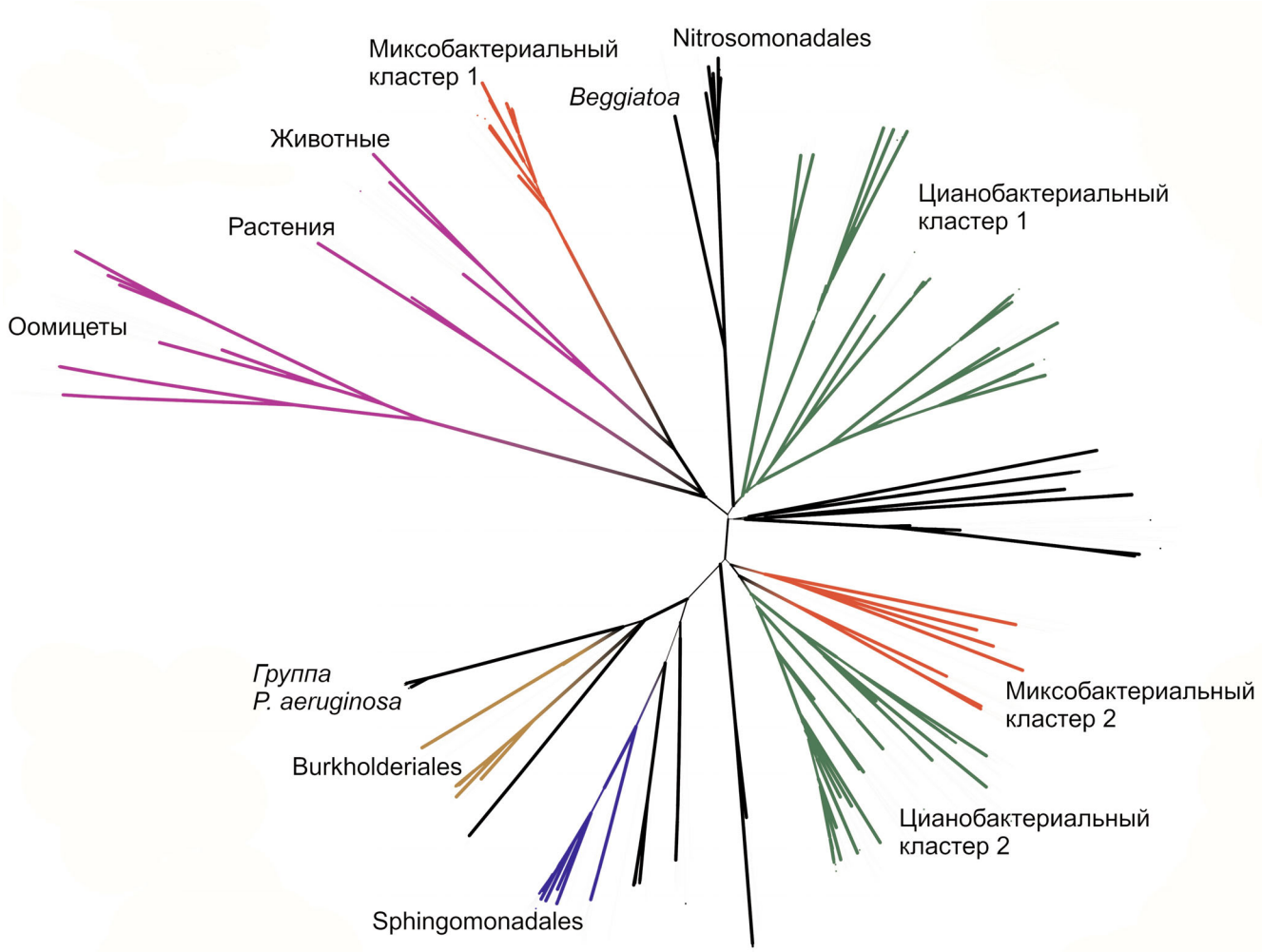


Рис. 4. Исходное филогенетическое дерево для всех проанализированных липоксигеназ, построенное методом минимальной эволюции в программе MEGA [37]. Уровни бутстрэп-поддержки представлены толщиной линий. Изображение получено с использованием сервера iTOL [38]

При этом миксобактериальные кластеры, как и цианобактериальные, перекрываются по таксономическому составу, и часть штаммов в них совпадает. Это приводит к вопросу о том, у какой из этих таксономических групп (цианобактерии или миксобактерии) липоксигеназы появились впервые, а какая заимствовала их путём горизонтального переноса? Существует третий вариант, при котором оба таксона унаследовали липоксигеназы от общего предка, однако он представляется маловероятным: топология деревьев и сети не отражает филогении основных таксонов бактерий (в частности миксобактерии не находятся в тесном родстве с цианобактериями). Кроме того, из такой гипотезы следовало бы наличие липоксигеназ у последнего общего предка бактерий с утратой их большинством ныне живущих таксонов, что сомнительно.

Для решения данного вопроса мы проанализировали деревья, на которых представлены только миксобактерии и цианобактерии (рис. 5, *а*). Мы обнаружили, что миксобактериальный кластер 1 (самый объёмный) имеет сестринскую группу цианобактериальных липоксигеназ с бутстрэп-поддержкой 100. Данная группа не

а

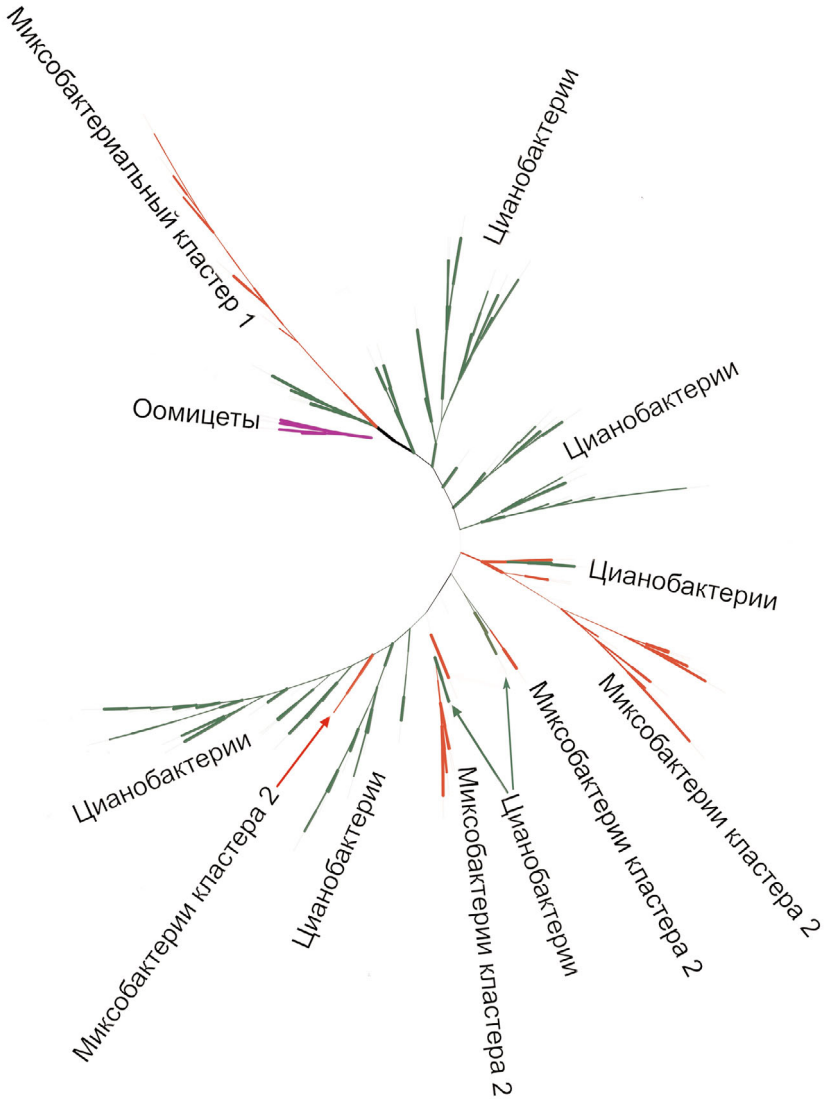


Рис. 5. *а* – Филогенетическое дерево, прицельно отображающее филогенетические отношения липоксигеназ цианобактерий и миксобактерий (метод ближайшего соседа, программа MAFFT [33, 34]). Оомицеты использованы в качестве внешней группы. Уровни бутстрэп-поддержки представлены толщиной линий. Ввиду отображения дополнительных групп цианобактериальные кластеры чётко не выделяются, в то время как кластеры миксобактерий по-прежнему узнаваемы. Изображение получено с помощью сервера iTOL [38]

отображена на деревьях для всего набора данных, так как удалена при выравнивании программой MaxAlign. Аналогично данный кластер располагается в филогенетической сети для той же самой подвыборки (рис. 5, *б*). В силу этого маловероятен горизонтальный перенос липоксигеназ от общего предка миксобактерий к цианобактериям – скорее следует предположить прямой или опосредованный перенос от цианобактерий к миксобактериям.

Миксобактериальный кластер 2 во всех деревьях представлен несколькими стволами, что приводит к наиболее «экономной» гипотезе. Она состоит в возникновении липоксигеназы у общего предка цианобактерий и в горизонтальном переносе к миксобактериям обоих её изоферментов. Возможно, сначала произошёл однократный перенос первого изофермента к общему предку миксобактерий, давший начало миксобактериальном кластеру 1. Далее последовал множественный перенос второго изофермента к миксобактериям после разделения их на несколько ветвей, что отражается в наших моделях как миксобактериальный кластер 2.

В построенных нами деревьях ветви, образованные эукариотами, тяготели к цианобактери-

б

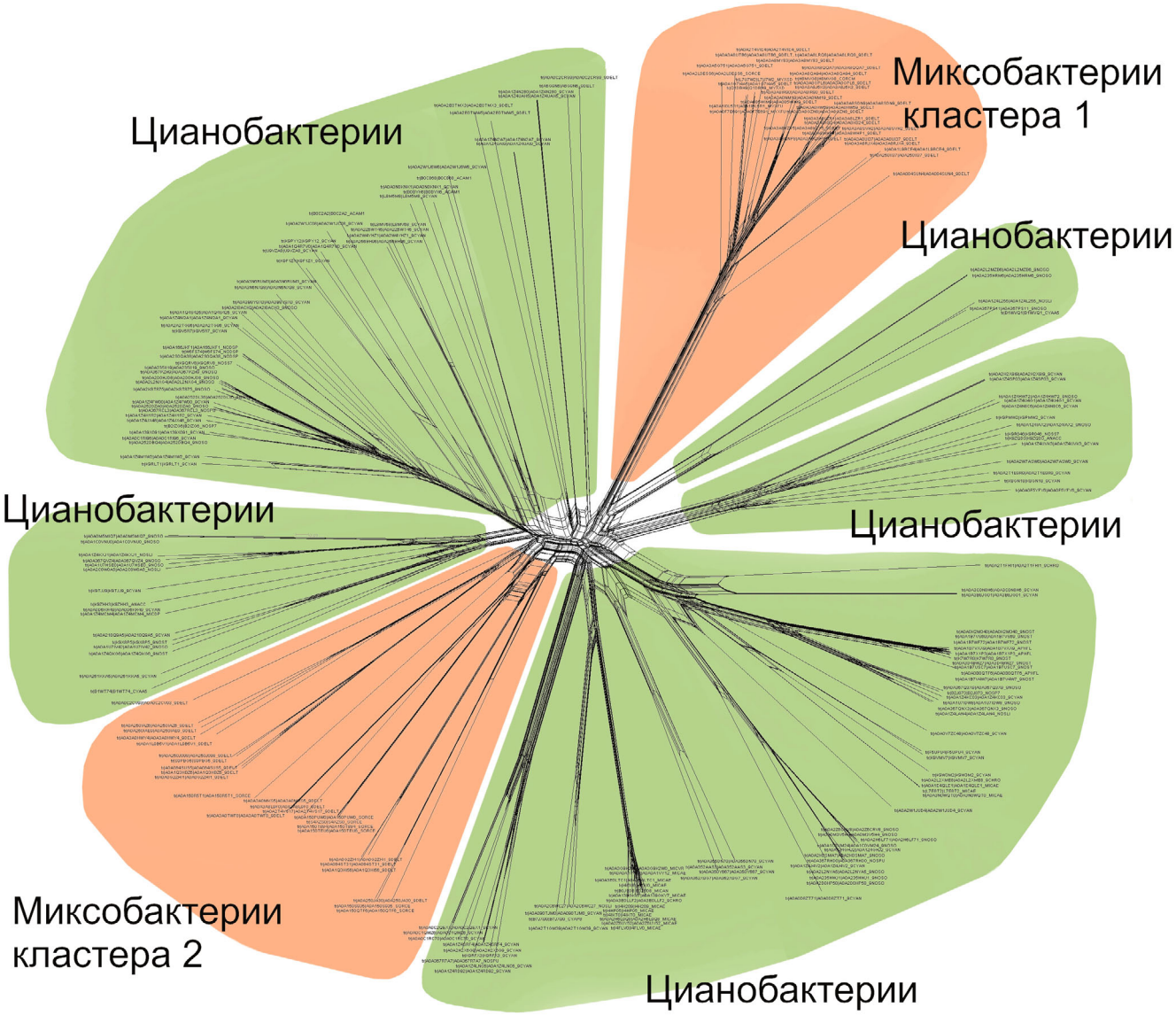


Рис. 5. *б* – Филогенетическая сеть для липоксигеназ миксобактерий и цианобактерий. Как и на рис. 5, *а*, миксобактериальный кластер 1 имеет сестринскую группу цианобактерий. Также более чётко визуализируется миксобактериальный кластер 2. Изображение построено с использованием программы SplitsTree [39]

альному кластеру 1, но нет более детальных данных об их эволюционных отношениях. Топология их варьировалась в разных деревьях, но они нигде не образовывали монофилетического кластера. В филогенетической сети они исходят из одного сетеобразного кластера, однако это может быть следствием притяжения длинных ветвей. Таким образом, эукариоты, возможно, получили свои липоксигеназы в результате нескольких последовательных событий горизонтального переноса генов.

Мы построили дерево для выборки эукариот и миксобактерий кластера 1. В нём прослеживается общее происхождение липоксигеназ оомицет и марганцевых липоксигеназ грибов (бутстрэп-поддержка 93) (рис. 6). Это особенно интересно в контексте сходной жизненной формы и экологии этих организмов. Также уверенно можно говорить о происхождении липоксигеназ растений и зелёных водорослей от общего предка (бутстрэп-поддержка 95), что ожидаемо с биологических позиций. Можно предположить близкое родство липоксигеназ инфузорий *Oxytrichia trifallax* и *Stylonichia lemnae* и липоксигеназ диктиостелиевых слизевиков (*Dictyosteliomycetes*) (бутстрэп-поддержка 63,6). Последние также образуют монофилетический кластер с бутстрэп-поддержкой 100, однако последовательность простостелиевого слизевика *Planoprotostelium fungivorum* оказывается за его пределами, их происхождение неясно.

Самой интересной находкой является тесная филогенетическая связь между липоксигеназами животных и миксобактериальным кластером 1 (рис. 6). Эти две группы в построенных деревьях имеют общего предка с бутстрэп-поддержкой до 76, при этом липоксигеназы животных не кластеризуются с другими эукариотами. В филогенетической сети миксобактериальный кластер 1 находится внутри сетеобразного кластера эукариот. Такая тесная связь позволяет предположить либо горизонтальный перенос липоксигеназ к миксобактериям от животных, либо обратный процесс.

В реконструированной нами эволюционной истории крупные кластеры липоксигеназ оказываются связаны с многоклеточными жизненными формами организмов. Такая тенденция прослеживается начиная с возникновения фермента у общего предка представленных в анализе цианобактерий: скорее всего, он был многоклеточным [40, 41]. Паттерн распределения липоксигеназ у его многоклеточных и одноклеточных потомков аналогичен распространению ре-

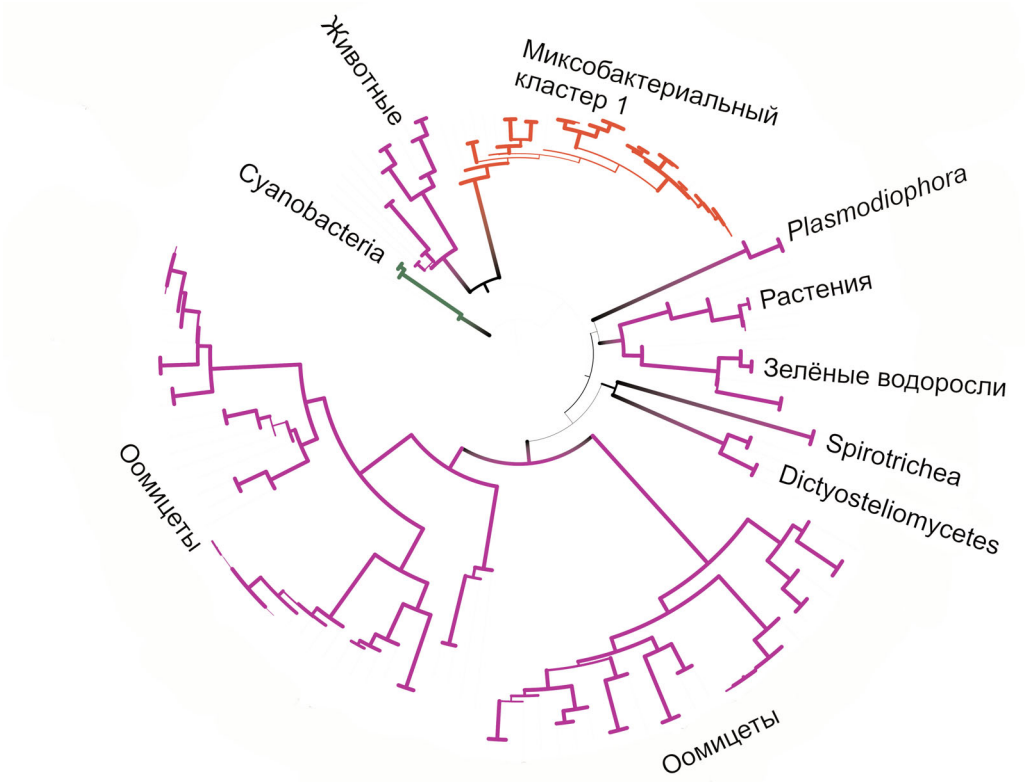


Рис. 6. Филогенетическое дерево, прицельно отображающее филогенетические отношения липоксигеназ эукариот и миксобактерий кластера 1 (метод минимальной эволюции, программа MEGA [37], визуализация в iTOL [38]). Цианобактерии использованы как внешняя группа, величины бутстрэп-поддержки представлены толщиной линий

Встречаемость липоксигеназы у бактерий – паразитов и симбионтов

Порядок	Виды
Burkholderiales	*Variovorax* sp. *YR752*, *V.* sp. *YR750*, *V.* sp. *SCN 67-85*, *V.* sp. *Root434*, *V.* sp. *Root411*, *V.* sp. *PDC80*, *V.* sp. *EL159*, V. sp. *CF313*, *V.* sp. *770b2*, *V.* sp. *54* *Variovorax paradoxus*, *V. guangxiensis*, *V. gossypii*, *Pelomonas* sp. *Root1237*, *P.* sp. *Root1217*, *Massilia namucuonensis*, *Duganella* sp. *HH105*, *Burkholderia cepacia*, *B. ubonensis*, *B. gladioli*, *B. singularis*, *B. pyrrocinia*, *B. anthina*, *B. thailandensis*, *B. stagnalis*, *B.* sp. *MSHR3999*, *B.* sp. *Bp9126*, *B.* sp. *Bp9125*, *B.* sp. *Bp9002*, *Acidovorax cavernicola*, [*Pseudomonas*] *mesoacidophila*
Corynebacteriales	*Nocardia seriolae*, *Nocardia pseudobrasiliensis*, *N. altamirensis*, *Mycobacteroides abscessus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus* sp. *C1-24*, *Rhodococcus* sp. *66b*
Enterobacterales	*Yersinia nurmii*, *Pluralibacter gergoviae*, *Photorhabdus temperata*, *Kosakonia* sp. *AG348*, *K. sacchari*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Cedecea lapagei*, *Klebsiella pneumoniae*
Holosporales	*Candidatus Finniella inopinata*
Lactobacillles	*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*
Nitrospinae/ Tectomicrobia group	*Candidatus Entotheonella palauensis*
Oceanospirillales	*Ketobacter* sp., *K. alkanivorans*, *Gynuella sunshinyii*, *Endozoicomonas numazuensis* *Bermanella* sp. *47_1433_sub80_T6*
Oligoflexales	*Pseudobacteriovorax antillogorgiicola*, *Oligoflexus tunisiensis*
Pseudomonadales	*Pseudomonas* sp. *RW410*, *P.* sp. *MWU13-2625*, *P.* sp. *MWU12-2534b*, *P.* sp. *HMSC065H01*, *P.* sp. *HMSC059F05*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*
Pseudonocardiales	*Kutzneria* sp. *744*, *K. buriramensis*, *K. albida*, *Amycolatopsis xylanica*, *Pseudonocardia acaciae*
Streptomycetales	*Streptacidiphilus albus*
Vibrionales	*Vibrio* sp. *vnigr-6D03*, *V. quintilis*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, *Photobacterium proteolyticum*, *P. profundum*, *P. marinum*, *P. indicum*, *P. frigidiphilum*, *Grimontia* sp. *AD028*, *G. marina*, *Grimontia indica*, *G. celer*, *Enterovibrio norvegicus*, *Enterovibrio coralii*, *E. calviensis*, *Enterovibrio nigricans*

Примечание: красным цветом выделены бактерии – оппортунистические патогены человека, зелёным – патогены и симбионты растений, синим – паразиты и симбионты животных, оранжевым выделены бактерии, несущие молекулярные признаки оппортунистической патогенности. Виды, выделенные двумя цветами, выполняют две экологические функции. На сером фоне даны названия бактерий, для которых экофизиология на сегодняшний день не описана. Название рода в квадратных скобках обозначает недавнюю реклассификацию.

гуляторов, необходимых для дифференцировки [41]: высокая встречаемость у многоклеточных форм и низкая – у одноклеточных.

Предполагаемый нами эволюционный путь липоксигеназ следует за появлением многоклеточности в различных таксонах. Как таксономически, так и филогенетически липоксигеназы связаны с образованием многоклеточных структур. Так как у «истинных» многоклеточных организмов липоксигеназы задействованы в межклеточной сигнализации, можно предположить, что они выполняют аналогичную функцию у бактерий и простейших, образующих многоклеточные формы. Таким образом, наши данные поддерживают гипотезу о связи бактериальных и протозойных липоксигеназ с межклеточной сигнализацией (гипотеза (а), «Введение»).

Немногочисленные экспериментальные данные по функции липоксигеназ микроорганизмов могут служить дополнительным подтверждением этой гипотезы. Даже не образующая многоклеточные структуры *P. aeruginosa* использует оксилипины как медиаторы чувства кворума [42], у образующего многоклеточные структуры *M. xanthus* продукты липоксигеназы усиливают дёргающуюся (twitching) подвижность [43]. У мутантного по гену липоксигеназы *Dictyostelium discoideum*, относящегося к Mycetozoa, нарушена кульминационная фаза формирования плодового тела [44].

Таксономическое распределение липоксигеназ поддерживает гипотезу об их участии в сигнализации «бактерия–хозяин». Помимо цианобактерий, миксобактерий и некоторых эукари-

от, крупные кластеры образуют только липоксигеназы сфингобактерий (Sphingomonadales) и представители порядка Burkholderiales. Остальные липоксигеназы встречаются спорадически у отдельных представителей рода, семейства или порядка. В филогенетических деревьях они образуют одиночные ветви или образуют небольшие таксономически гетерогенные кластеры. В дальнейшем мы будем говорить о такой ситуации как о спорадической встречаемости.

Ниже будет показано, что представители порядка Burkholderiales обладают экофизиологическими свойствами, общими со спорадически встречающимися обладателями липоксигеназ, поэтому будут рассматриваться вместе с ними.

Многие бактерии из данной группы патогенны (таблица). Множественные последовательности липоксигеназ были обнаружены у *P. aeruginosa*, что согласуется с экспериментальными данными. Мы обнаружили липоксигеназы у многих других бактерий со сходным профилем патогенности. Почти все они являются оппортунистическими или нозокомиальными патогенами и сравнительно редко вызывают внебольничные инфекции у иммунокомпетентных лиц. Обнаруженные обладатели липоксигеназ способны поражать многие органы, однако для большинства из них наиболее характерны хирургические инфекции кожи и мягких тканей, поражение лёгких (у пациентов, страдающих сопутствующей лёгочной патологией), сепсис, инфицирование катетеров [45–50]. Для них также характерна резистентность к антибиотикам.

Среди этой группы бактерий присутствуют как широко известные оппортунистические патогены (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* [51], *Enterobacter cloacae* [52]), так и «новые» (emerging) возбудители с аналогичными свойствами. К числу последних относятся такие бактерии, как *Nocardia pseudobrasiliensis* [53], *Rhodococcus erythropolis* [54], и такой яркий представитель, как недавно описанная *Cedecea lapagei* [55, 56]. К ним же относятся некоторые представители рода *Burkholderia*: *B. stagnalis* и *B. singularis*, которые были впервые выделены из респираторных образцов [57, 58], *Burkholderia gladioli*, ранее известная как патоген растений и недавно описанная как возбудитель инфекций у человека [59–61], и *Burkholderia thailandensis* [62].

Как и в обзоре Horn et al. [14], мы не обнаружили липоксигеназ у специфических облигатных патогенов. [14]. Единственное различие касается *K. pneumoniae*, у которой мы обнаружили липоксигеназу. Однако эта бактерия входит в группу преимущественно оппортунистических патогенов *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*. Её высокая внебольничная патогенность считается исключительной чертой и следствием наличия массивной полисахаридной капсулы [45].

Таким образом, спорадическая встречаемость липоксигеназ оказывается связана с патогенностью, но не со специфическими высокопатогенными видами (что большей частью согласуется с результатами обзора Horn et al. [14]). Липоксигеназы более характерны для бактерий с ослабленной патогенностью, поражающих только иммунокомпрометированных хозяев. Особенно чётко это наблюдается на примере *B. thailandensis* (обладателя липоксигеназы), близкородственной возбудителю мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* (лишённой липоксигеназы), но отличающейся от неё существенно более низкой вирулентностью [62]. В тот же самый тренд укладывается наличие липоксигеназы у условно-патогенных *Burkholderia*, но отсутствие у возбудителя сапа *Burkholderia mallei* и возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei*.

Среди выявленных обладателей липоксигеназы встречаются не только оппортунистические патогены, но и бактерии, ассоциированные с животными или растениями. Они могут проявлять себя и как патогены, и как симбионты. Обладатели липоксигеназы с симбиотическими функциями обычно специализированы на определённом круге хозяев. Виды, ассоциированные с растениями, зачастую являются стимулирующими рост (growth-promoting) или биоконтрольными агентами. Таковы *Rhodococcus 66b* [63], *Variovorax paradoxus* [64, 65], *Gynuella sunshinyii* [66] и *Pseudomonas fluorescens* (может поражать человека, но это не характерно для неё и происходит редко) [46, 67, 68].

Патогенные представители, наоборот, поражают и растения, и человека. Яркие примеры таких бактерий – *B. gladioli*, *Burkholderia cepacia* [50] и сама *P. aeruginosa*, также являющаяся фитопатогеном и поражающая широкий круг хозяев [69, 70]. Таким образом, патогенные обладатели липоксигеназы являются так называемыми межцарственными патогенами (cross-kingdom pathogens). По данной группе патогенов написан подробный обзор [71], где рассматриваются молекулярные предпосылки для таких свойств. Для человека межцарственные патогены обычно являются возбудителями оппортунистических или нозокомиальных инфекций в связи с тем, что их факторы патогенности, хорошо функционирующие в организме растений, не могут в полной мере преодолеть действие защитных систем организма человека [71, 72]. Возможно, липоксигеназа является ещё одним типичным фактором

вирулентности, предрасполагающим к «межцарственному перескоку» (cross-kingdom host jump) и оппортунистической патогенности.

Обнаружение липоксигеназ у бактерий со сходными патогенными свойствами поддерживает гипотезы об их связи с вирулентностью. Большинство описанных выше бактерий рассмотрены как аналоги *P. aeruginosa*, липоксигеназа которой охарактеризована как фактор уклонения от иммунного ответа. Полученные нами данные позволяют распространить это предположение на многие другие виды. Таким образом, данные о распространенности липоксигеназ согласуются с гипотезой об их участии в инвазии (гипотезы (б) и (в), «Введение»).

Это предположение также можно распространить на некоторые обладающие липоксигеназой бактерии, экофизиология которых пока не описана. У таких видов обнаружены генные или белковые последовательности, свидетельствующие в пользу возможной условной патогенности или переноса генов вирулентности от возбудителей оппортунистических инфекций. К ним относятся:

1) *Grimontia indica*, обладающая набором факторов вирулентности, «урезанным» по сравнению с типовым патогенным видом *Grimontia hollisae*, что может рассматриваться как молекулярный признак условной патогенности [73];

2) *Oligoflexus tunisiensis*, имеющий ген RND-насоса, на 67% сходный с генами мультилекарственной резистентности *Achromobacter xylosooxidans* и *P. aeruginosa* [74];

3) оказавшиеся в группе *P. aeruginosa* псевдомонады с неясной видовой принадлежностью: *Pseudomonas* sp. *HMSC059F05*, *Pseudomonas* sp. *HMSC065H01* и *Pseudomonas* sp. *RW410*; по нашим собственным результатам, полученным при поиске BLAST, экзотоксин A и эластаза этих штаммов обнаруживают высокую степень идентичности таковым у *P. aeruginosa* (99,5% и более).

Ассоциированные с животными обладатели липоксигеназ в основном связаны с морскими видами. Так, *Endozoicomonas numazuensis* [75] и *Candidatus Entotheonella palauensis* [76] являются симбионтами губок, *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* [77] и *Enterovibrio coralii* [78] выделены из кораллов, *Enterovibrio nigricans* [79] и *Enterovibrio norvegicus* [80] – из кишечника рыб. *Nocardia seriolae* охарактеризована как возбудитель нокардиоза рыб [81].

Один из ассоциированных с животными видов, *Photorhabdus temperata*, является одновременно симбионтом энтомопатогенной нематоды и патогеном для её хозяев [82]. В целом, среди рассмотренных обладателей липоксигеназы наблюдаются как симбиотические, так и паразитические стратегии. Это делает более вероятной гипотезу (в) из «Введения» – уклонение от иммунного ответа, чем гипотезу (б), связанную с инвазивным ростом: подавление иммунитета хозяина необходимо и симбионту, и патогену, в то время как симбионт не нуждается в факторах инвазивного роста.

Филогенетические данные поддерживают предположение о связи липоксигеназ с симбиозом и патогенностью. Липоксигеназы некоторых условно-патогенных бактерий образуют на филогенетических деревьях и в сети кластер из близкородственных последовательностей, отличающихся лишь единичными аминокислотными заменами. Бутстрэп-поддержка данного кластера равна 100. Большая часть последовательностей в нём принадлежит *P. aeruginosa*, поэтому мы назвали его «группа *P. aeruginosa*». Помимо упомянутого вида эта группа включает в себя липоксигеназы опасных внутригоспитальных патогенов: *Streptococcus dysgalactiae*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, а также липоксигеназу *P. fluorescens*.

Вследствие малого числа различий между последовательностями группы *P. aeruginosa* филогенетические отношения внутри неё неясны (рис. 7): бутстрэп-поддержка большинства узлов филогенетического дерева крайне низка (30 и менее). На фоне этого выделяются листья, образуемые липоксигеназами *S. dysgalactiae*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. fluorescens* и одной из липоксигеназ *A. baumannii* – вместе с сестринскими последовательностями *P. aeruginosa* они отходят от узлов с относительно высокой бутстрэп-поддержкой (>65%). Это свидетельствует о совсем недавних (по эволюционным меркам) горизонтальных переносах гена липоксигеназы от *P. aeruginosa* к другим внутригоспитальным патогенам. Таким образом, липоксигеназа может распространяться между патогенами также, как гены резистентности к антибиотикам (следует отметить, что резистентность к антибиотикам и наличие липоксигеназы чаще всего сочетаются у патогенов из нашего списка).

Дополнительным подтверждением связи липоксигеназ и патогенеза/симбиоза служит тот факт, что сама группа *P. aeruginosa* расположена внутри клады, образованной патогенными и симбиотическими представителями порядка Burkholderiales (рис. 8). В этой же кладе находятся патогенные представители рода *Nocardia*. Бутстрэп-поддержка узла в основании клады составляет 90 – в дереве, построенном в MAFFT, и более 99 – в дереве, построенном в программе MEGA. Скорее всего, наличие этой

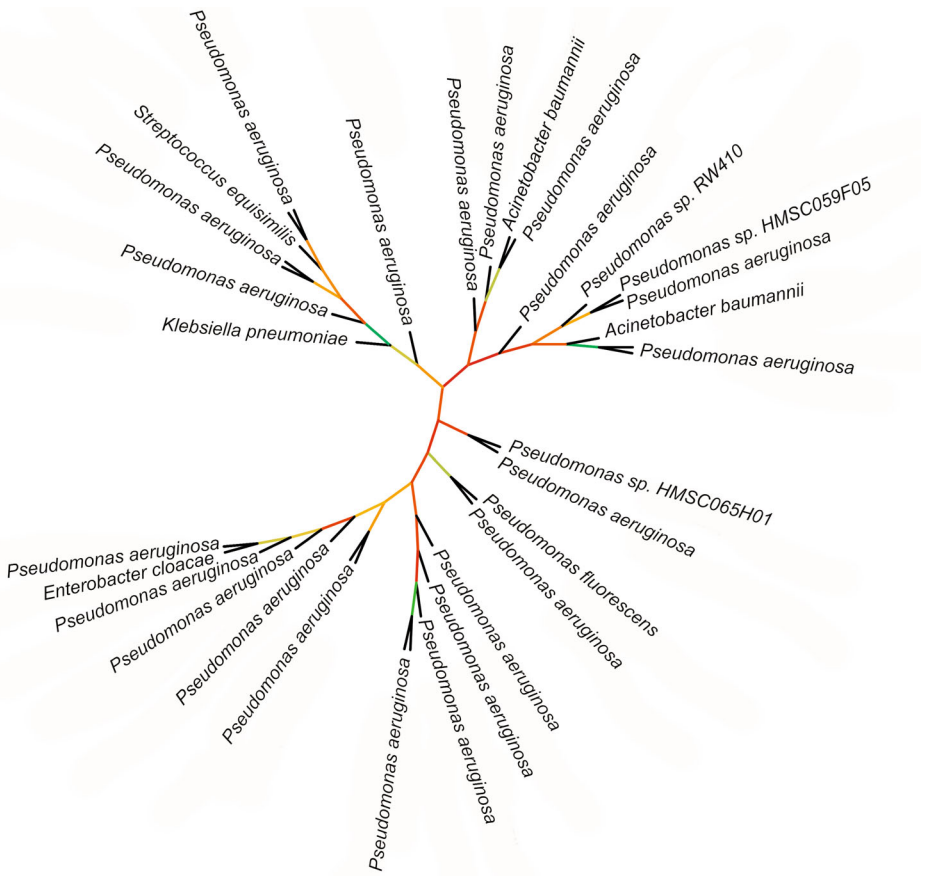


Рис. 7. Исходное филогенетическое дерево для группы *P. aeruginosa*, построенное методом минимальной эволюции в программе MEGA [37]. В отличие от предыдущих иллюстраций, уровни бутстрэп-поддержки показаны цветом (красный – низкая поддержка, зелёный – высокая). Визуализация в iTOL [38]

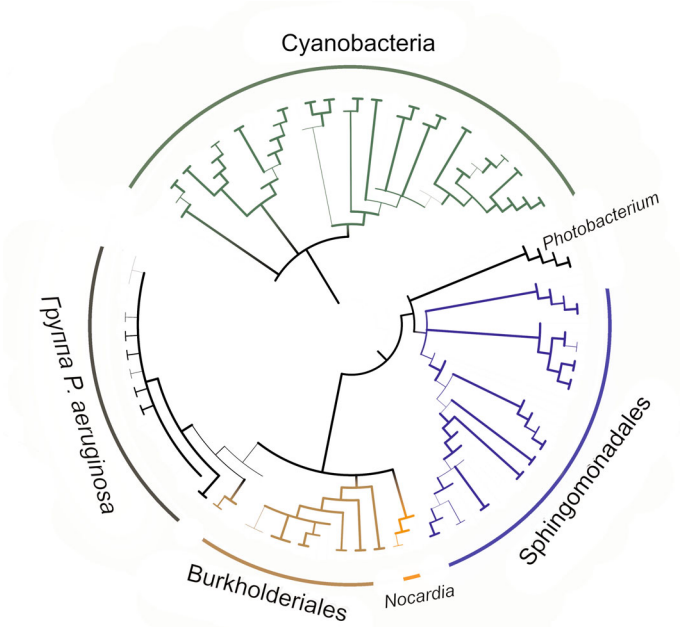


Рис. 8. Консенсусное дерево, построенное в программе MEGA [37] методом минимальной эволюции для представителей группы *P. aeruginosa*, порядков Burkholderiales и Sphingomonadales, родов *Nocardia* и *Photobacterium*. Цианобактерии использованы в качестве внешней группы для расчёта бутстрэп-поддержки. На данном дереве длины ветвей не соответствуют эволюционным расстояниям (в группе *P. aeruginosa* они крайне малы). Величины бутстрэп-поддержки представлены толщиной ветвей. Визуализация в iTOL [38]

клады отражает события горизонтального переноса гена липоксигеназы от одной патогенной/симбиотической бактерии к другой.

Мы также провели дополнительное филогенетическое исследование липоксигеназы «нового» (emerging) нозокомиального патогена *C. lapagei*. Ввиду большого количества инсерций и делеций удалось изучить только один изофермент. Двумя методами (построением филогенетического дерева методом минимальной эволюции и построением филогенетической сети) удалось показать, что её липоксигеназа тесно родственна липоксигеназе другого нозокомиального патогена *Pluralibacter gergoviae*. Это соответствует предположению о липоксигеназе, как о горизонтально переносимом факторе вирулентности, и демонстрирует эволюционную связь липоксигеназ и патогенности.

Заключительные положения и нерешённые проблемы. При поиске в BLAST с теми же запросами, что для бактерий и простейших, не удалось обнаружить липоксигеназ у архей. Это согласуется с данными Horn et al. [14] и объяснимо с биохимических позиций: липоксигеназный путь начинается с фосфолипазы A_2, расщепляющей фосфолипиды цитоплазматической мембраны, что невозможно у архей в связи с иным строением мембраны. Этот факт также согласуется с нашим сценарием возникновения липоксигеназ у бактерий (а именно – цианобактерий) и заимствования её эукариотами.

К сожалению, многие бактерии, которые, по результатам нашего исследования, обладают липоксигеназой, были открыты лишь в последнее время, и их экофизиология недостаточно охарактеризована. В силу этого не удаётся сделать никаких выводов относительно бактерий порядков Alteromonadales, Bdellovibrionales, Cytophagales, Chromatiales, Sphingomonadales и представителей родов *Photobacterium*, *Enterovibrio*. Дальнейшие исследования, возможно, смогут дать ответ на этот вопрос. В группе простейших пока не удаётся выдвинуть гипотезы относительно функциональной роли липоксигеназ у видов *Oxytrichia trifalax*, *S. lemnae*, *Emiliania huxleyi* и *Thecamonas trahens*. Дальнейшие исследования в этом направлении представляются особенно интересными, так как могут предоставить дополнительные подтверждения или опровержения нашим выводам.

Обнаруженные в нашем исследовании липоксигеназы плазмодиофоровых слизевиков и представителей рода *Phytophtora* интересны тем, что могут укладываться в обе гипотезы: как о связи липоксигеназ с многоклеточностью, так и о связи с патогенностью. С одной стороны, *Phytophthora* имеет грибоподобное строение, а плазмодиофоровые слизевики образуют синцитиальный плазмодий, что можно рассматривать как тенденцию к многоклеточности. С другой стороны, представители обоих таксонов – фитопатогенны. Вопрос, какую конкретно роль выполняет липоксигеназа у данных организмов, пока остаётся открытым.

В начале работы был суммирован ряд имеющихся в настоящее время гипотез о функциональном значении бактериальных и протозойных липоксигеназ. Мы провели биоинформатический анализ с целью найти подтверждение каким-либо из них.

Результаты обработки таксономических данных, реконструкции эволюционных деревьев и сетей согласуются с двумя из рассмотренных предположений – о связи с многоклеточностью и межклеточной сигнализацией (гипотеза (а) во «Введении») и о подавлении иммунного ответа хозяина паразитом или симбионтом (гипотеза (в) во «Введении»).

Первая из гипотез имеет эволюционное значение. Появление липоксигеназ у организмов с примитивной межклеточной кооперацией и дифференцировкой может означать их участие в самом происхождении многоклеточности. Выяснение конкретных механизмов сигнального действия продуктов липоксигеназ требует дальнейших исследований.

Механизм сигнализации между царствами для подавления иммунного ответа хозяина, наоборот, более детально изучен на примере *P. aeruginosa*. Наши данные позволяют распространить эту гипотезу на большое число бактерий и приблизительно очертить их круг. Весьма вероятно, что такой стратегией пользуются многие внутригоспитальные и оппортунистические патогены, приобретая липоксигеназу друг от друга в результате горизонтального переноса. Такой фактор вирулентности по опасности становится в один ряд с генами резистентности к антибиотикам, что диктует необходимость пристального внимания к липоксигеназе у патогенных микроорганизмов.

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. Болдырев А. А., Кяйвяряйнен Е. И., Илюха В. А. (2017) *Биомембранология: учебное пособие*, ИНФРА-М, Москва.
2. Garreta, A., Val-Moraes, S. P., García-Fernández, Q., Busquets, M., Juan, C., Oliver, A., Ortiz, A., Gaffney, B. J., Fita, I., Manresa, A., and Carpena, X. (2013) Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *FASEB J.*, **27**, 4811-4821, doi: 10.1096/fj.13-235952.
3. Brash, A. R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J. Biol. Chem.*, **274**, 23679-23682, doi: 10.1074/jbc.274.34.23679.
4. Mashima, R., and Okuyama, T. (2015) The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives, *Redox Biol.*, **6**, 297-310, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.006.
5. Yokomizo, T. (2014) Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2, *J. Biochem.*, **157**, 65-71, doi: 10.1093/jb/mvu078.
6. Kanaoka, Y., and Boyce, J. A. (2004) Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses, *J. Immunol.*, **173**, 1503-1510, doi: 10.4049/jimmunol.173.3.1503.
7. Powell, W. S., and Rokach, J. (2015) Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 340-355, doi: 10.1016/j.bbalip.2014.10.008.
8. Kieran, N. E., Maderna, P., and Godson, C. (2004) Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease, *Kidney Int.*, **65**, 1145-1154, doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00487.x.
9. Brodhun, F., and Feussner, I. (2011) Oxylipins in fungi, *FEBS J.*, **278**, 1047-1063, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08027.x.
10. Хелдт Г.-В. (2011) *Биохимия растений*, БИНОМ, Лаборатория знаний, Москва.
11. Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development, *Ann. Bot.*, **100**, 681-697, doi: 10.1093/aob/mcm079.
12. Andreou, A., Brodhun, F., and Feussner, I. (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Prog. Lipid Res.*, **48**, 148-170, doi: 10.1016/j.plipres.2009.02.002.
13. De León, I. P., Hamberg, M., and Castresana, C. (2015) Oxylipins in moss development and defense, *Front. Plant. Sci.*, **6**, 483, doi: 10.3389/fpls.2015.00483.
14. Horn, T., Adel, S., Schumann, R., Sur, S., Kakularam, K. R., Polamarasetty, A., Redanna, P., Kuhn, H., and Heydeck, D. (2015) Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling, *Prog. Lipid Res.*, **57**, 13-39, doi: 10.1016/j.plipres.2014.11.001.
15. Andreou, A. Z., Vanko, M., Bezakova, L., and Feussner, I. (2008) Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms, *Phytochemistry*, **69**, 1832-1837, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.002.
16. Lang, I., Göbel, C., Porzel, A., Heilmann, I., and Feussner, I. (2008) A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120, *Biochem. J.*, **410**, 347-357, doi: 10.1042/BJ20071277.
17. Wang, X., Lu, F., Zhang, C., Lu, Y., Bie, X., Ren, D., and Lu, Z. (2014) Peroxidation radical formation and regiospecificity of recombinated *Anabaena* sp. lipoxygenase and its effect on modifying wheat proteins, *J. Agric. Food. Chem.*, **62**, 1713-1719, doi: 10.1021/jf405425c.
18. An, J. U., Hong, S. H., and Oh, D. K. (2018) Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cel. Biol. Lipids*, **1863**, 823-833, doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.014.
19. Vance, R. E., Hong, S., Gronert, K., Serhan, C. N., and Mekalanos, J. J. (2004) The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2135-2139, doi: 10.1073/pnas.0307308101.
20. Banthiya, S., Kalms, J., Yoga, E. G., Ivanov, I., Carpena, X., Hamberg, M., Kuhn, H., and Scheerer, P. (2016) Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 1681-1692, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.002.
21. Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2001) Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology*, **147**, 3199-3200, doi: 10.1099/00221287-147-12-3199.
22. Koeduka, T., Kajiwara, T., and Matsui, K. (2007) Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Eschelichia coli*, *Curr. Microbiol.*, **54**, 315-319, doi: 10.1007/s00284-006-0512-9.
23. Dar, H. H., Tyurina, Y. Y., Mikulska-Ruminska, K., Shrivastava, I., Ting, H. C., et al. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host polyunsaturated phosphatidylethanolamines to trigger theft-ferroptosis in bronchial epithelium, *J. Clin. Invest.*, **128**, 4639-4653, doi: 10.1172/JCI99490.
24. Goloshchapova, K., Stehling, S., Heydeck, D., Blum, M., and Kuhn, H. (2019) Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns, *MicrobiologyOpen*, **8**, e00775, doi: 10.1002/mbo3.775.
25. Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M. C., Busquets, M., Manresa, A. (2013) Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 4737-4747, doi: 10.1007/s00253-013-4887-9.
26. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402, doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
27. UniProt Consortium (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2699, doi: 10.1093/nar/gky092.
28. Yoshimoto, T., Yamamoto, Y., Arakawa, T., Suzuki, H., Yamamoto, S., Yokoyama, C., Tanabe, T., and Toh, H. (1990) Molecular cloning and expression of human arachidonate 12-lipoxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1230-1235, doi: 10.1016/0006-291x(90)91580-l.
29. Hörnsten, L., Su, C., Osbourn, A. E., Hellman, U., and Oliw, E. H. (2002) Cloning of the manganese lipoxygenase gene reveals homology with the lipoxygenase gene family, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2690-2697, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02936.x.
30. Vidal-Mas, J., Busquets, M., and Manresa, A. (2005) Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**, 245-251, doi: 10.1007/s10482-004-4021-1.

31. Marchler-Bauer, A., and Bryant, S. H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly, *Nucleic Acids Res.*, **32**, W327-W331, doi: 10.1093/nar/gkh454.
32. Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L. Y., and Bryant, S. H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D200-D203, doi: 10.1093/nar/gkw1129.
33. Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Brief. Bioinform.*, **20**, 1160-1166, doi: 10.1093/bib/bbx108.
34. Kuraku, S., Zmasek, C. M., Nishimura, O., and Katoh, K. (2013) aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, W22-W28, doi: 10.1093/nar/gkt389.
35. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3059-3066, doi: 10.1093/nar/gkf436.
36. Gouveia-Oliveira, R., Sackett, P. W., and Pedersen, A. G. (2007) MaxAlign: maximizing usable data in an alignment, *BMC Bioinformatics*, **8**, 312, doi: 10.1186/1471-2105-8-312.
37. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
38. Letunic, I., and Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W242-W245, doi: 10.1093/nar/gkw290.
39. Huson, D. H., and Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 254-267, doi: 10.1093/molbev/msj030.
40. Schirrmeister, B. E., Antonelli, A., and Bagheri, H. C. (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria, *BMC Evol. Biol.*, **11**, 45, doi: 10.1186/1471-2148-11-45.
41. Elhai, J., and Khudyakov, I. (2018) Ancient association of cyanobacterial multicellularity with the regulator HetR and an RGSGR pentapeptide-containing protein (PatX), *Mol. Microbiol.*, **110**, 931-954, doi: 10.1111/mmi.14003.
42. Martínez, E., Cosnahan, R. K., Wu, M., Gadila, S. K., Quick, E. B., Mobley, J. A., and Campos-Gómez, J. (2019) Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*, *Commun. Biol.*, **2**, 1-10, doi: 10.1038/s42003-019-0310-0.
43. An, J. U., and Oh, D. K. (2018) Stabilization and improved activity of arachidonate 11S-lipoxygenase from proteobacterium *Myxococcus xanthus*, *J. Lipid Res.*, **59**, 2153-2163, doi: 10.1194/jlr.M088823.
44. Basu, S., Fey, P., Pandit, Y., Dodson, R., Kibbe, W. A., and Chisholm, R. L. (2012) DictyBase 2013: integrating multiple Dictyostelid species, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D676-D683, doi: 10.1093/nar/gks1064.
45. Левинсон У. (2015) *Медицинская микробиология и иммунология* (пер. с англ.), БИНОМ, Лаборатория знаний, Москва.
46. Бойцов А. Г., Васильев О. Д. (2013) В кн. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* (под ред. Долгова В. В. и Меньшикова В. В.), ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 380-388.
47. Кафтырева Л. А., Бойцов А. Г., Макарова М. А. (2013) В кн. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* (под ред. Долгова В. В. и Меньшикова В. В.), ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 342-365.
48. Тотолян А. А., Бурова Л. А., Дмитриев А. В., Суворов А. Н. (2013) В кн. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* (под ред. Долгова В. В. и Меньшикова В. В.), ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 417-435.
49. Van't Wout, E. F., van Schadewijk, A., van Boxtel, R., Dalton, L. E., Clarke, H. J., Tommassen, J., Marciniak, S. J., and Hiemstra, P. S. (2015) Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* induce both the unfolded protein and integrated stress responses in airway epithelial cells, *PLoS Pathog.*, **11**, doi: 10.1371/journal.ppat.1004946.
50. Stoyanova, M., Pavlina, I., Moncheva, P., and Bogatzevska, N. (2007) Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species, *Biotechnology Biotechnological Equipment*, **21**, 306-310, doi: 10.1080/13102818.2007.10817465.
51. Antunes, L., Visca, P., and Towner, K. J. (2014) Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen, *Pathog. Dis.*, **71**, 292-301, doi: 10.1111/2049-632X.12125.
52. Davin-Regli, A. (2015) *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment, *Front. Microbiol.*, **6**, 392, doi 10.3389/fmicb.2015.00392.
53. Lebeaux, D., Lanternier, F., Degand, N., Catherinot, E., Podglajen, I., Rubio, M. T., Suarez, F., Lecuit, M., Mainardi, J.-L., and Lortholary, O. (2010) *Nocardia pseudobrasiliensis* as an emerging cause of opportunistic infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 656-659, doi: 10.1128/JCM.01244-09.
54. Baba, H., Nada, T., Ohkusu, K., Ezaki, T., Hasegawa, Y., and Paterson, D. L. (2009) First case of bloodstream infection caused by *Rhodococcus erythropolis*, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2667-2669, doi: 10.1128/JCM.00294-09.
55. Hong, S. K., Lee, J. S., and Kim, E. C. (2015) First Korean case of *Cedecea lapagei* pneumonia in a patient with chronic obstructive pulmonary disease, *Ann. Lab. Med.*, **35**, 266-268, doi: 10.3343/alm.2015.35.2.266.
56. Herrera, V. R. C., De Silva, M. F. R., Alcaraz, H. O., Espiritu, G. C., Peña, K. C., and Melnikov, V. (2018) Death related to *Cedecea lapagei* in a soft tissue bullae infection: a case report, *J. Med. Case Rep.*, **12**, 328, doi: 10.1186/s13256-018-1866-x.
57. Vandamme, P., Peeters, C., De Smet, B., Price, E. P., Sarovich, D. S., Henry, D. A., Hird, T. J., Zlosnik, J. E. A., Mayo, M., Warner, J., Baker, A., Currie, B. J., and Carlier, A. (2017) Comparative genomics of *Burkholderia singularis* sp. *nov.*, a low G+C content, free-living bacterium that defies taxonomic dissection of the genus *Burkholderia*, *Front. Microbiol.*, **8**, 1679, doi: 10.3389/fmicb.2017.01679.
58. De Smet, B., Mayo, M., Peeters, C., Zlosnik, J. E., Spilker, T., Hird, T. J., LiPuma, J. J., Kidd, T. J., Kaestli, M., Ginther, J. L., Wagner, D. M., Keim, P., Bell, S. C., Jacobs, J. A., Currie, B. J., and Vandamme, P. (2015) *Burkholderia stagnalis* sp. *nov.* and *Burkholderia territorii* sp. *nov.*, two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 2265-2271, doi: 10.1099/ijs.0.000251.
59. Segonds, C., Clavel-Batut, P., Thouverez, M., Grenet, D., Le Coustumier, A., Plésiat, P., and Chabanon, G. (2009) Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli*, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1510-1516, doi: 10.1128/JCM.02489-08.

60. Quon, B. S., Reid, J. D., Wong, P., Wilcox, P. G., Javer, A., Wilson, J. M., and Levy, R. D. (2011) *Burkholderia gladioli* – a predictor of poor outcome in cystic fibrosis patients who receive lung transplants? A case of locally invasive rhinosinusitis and persistent bacteremia in a 36-year-old lung transplant recipient with cystic fibrosis, *Can. Respir. J.*, **18**, e64-e65, doi: 10.1155/2011/304179.
61. Imataki, O., Kita, N., Nakayama-Imaohji, H., Kida, J. I., Kuwahara, T., and Uemura, M. (2014) Bronchiolitis and bacteraemia caused by *Burkholderia gladioli* in a non-lung transplantation patient, *New Microbes. New Infect.*, **2**, 175, doi: 10.1002/nmi2.64.
62. Haraga, A., West, T. E., Brittnacher, M. J., Skerrett, S. J., and Miller, S. I. (2008) *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*, *Infect. Immun.*, **76**, 5402-5411, doi: 10.1128/IAI.00626-08.
63. Thatcher, L. F., Myers, C. A., O'Sullivan, C. A., and Roper, M. M. (2017) Draft genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain *66b*, *Genome Announc.*, **5**, e00229-17, doi: 10.1128/genomeA.00229-17.
64. Han, J. I., Spain, J. C., Leadbetter, J. R., Ovchinnikova, G., Goodwin, L. A., Han, C. S., Woyke, T., Davenport, K. W., and Orwin, P. M. (2013) Genome of the root-associated plant growth-promoting bacterium *Variovorax paradoxus* strain *EPS*, *Genome Announc.*, **1**, e00843-13, doi: 10.1128/genomeA.00843-13.
65. Han, J. I., Choi, H. K., Lee, S. W., Orwin, P. M., Kim, J., LaRoe, S. L., Kim, T.-G., O'Neil, J., Leadbetter, J. R., Lee, S. Y., Hur, C.-G., Spain, J. C., Ovchinnikova, G., Goodwin, L., and Han, C. (2011) Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110, *J. Bacteriol.*, **193**, 1183-1190, doi: 10.1128/JB.00925-10.
66. Chung, E. J., Park, J. A., Jeon, C. O., and Chung, Y. R. (2015) *Gynuella sunshinyii* gen. nov., sp. nov., an antifungal rhizobacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 1038-1043, doi: 10.1099/ijs.0.000060.
67. Gibb, A. P., Martin, K. M., Davidson, G. A., Walker, B., and Murphy, W. G. (1995) Rate of growth of *Pseudomonas fluorescens* in donated blood, *J. Clin. Pathol.*, **48**, 717-718, doi: 10.1136/jcp.48.8.717.
68. Gershman, M. D., Kennedy, D. J., Noble-Wang, J., Kim, C., Gullion, J., Kacica, M., Jensen, B., Pascoe, N., Saiman, L., McHale, J., Wilkins, M., Schoonmaker-Bopp, D., Clayton, J., Arduino, M., Srinivasan, A., and Pseudomonas fluorescens Investigation Team (2008) Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy, *Clin. Infect. Dis.*, **47**, 1372-1379, doi: 10.1086/592968.
69. Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., and Vivanco, J. M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation, *Plant Physiol.*, **134**, 320-331, doi: 10.1104/pp.103.027888.
70. Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L., and Tompkins, R. G. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8815-8821, doi: 10.1073/pnas.97.16.8815.
71. Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., and Thomma, B. P. (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 239-277, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x.
72. Relman, D. A., and Falkow, S. (2015) A molecular perspective of microbial pathogenicity, in *Principles and Practice of Infectious Diseases, Eighth Edition* (Bennett, J. E., Dolin, R., and Blaser, M. J., eds.), Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 1-10.
73. Singh, A., Vaidya, B., Khatri, I., Srinivas, T. N. R., Subramanian, S., Korpole, S., and Pinnaka, A. K. (2014) *Grimontia indica AK16T*, sp. nov., isolated from a seawater sample reports the presence of pathogenic genes similar to *Vibrio* genus, *PLoS One*, **9**, e85590, doi: 10.1371/journal.pone.0085590.
74. Nakai, R., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Baba, T., Nishijima, M., Karray, F., Sami Sayadi, S., Isoda, N., Naganuma, T., and Niki, H. (2016) Genome sequence and overview of *Oligoflexus tunisiensis Shr3 T* in the eighth class Oligoflexia of the phylum Proteobacteria, *Stand. Genomic. Sci.*, **11**, 90, doi: 10.1186/s40793-016-0210-6.
75. Nishijima, M., Adachi, K., Katsuta, A., Shizuri, Y., and Yamasato, K. (2013) *Endozoicomonas numazuensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from marine sponges, and emended description of the genus *Endozoicomonas* Kurahashi and Yokota 2007, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 709-714, doi: 10.1099/ijs.0.042077-0.
76. Schmidt, E. W., Obraztsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., and Haygood, M. G. (2000) Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ-proteobacterium,"*Candidatus Entotheonella palauensis*", *Marine Biol.*, **136**, 969-977, doi: 10.1007/s002270000273.
77. McCauley, E. P., Haltli, B., and Kerr, R. G. (2015) Description of *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the gorgonian octocoral *Antillogorgia elisabethae*, belonging to the family *Pseudobacteriovoracaceae* fam. nov., within the order *Bdellovibrionales*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 522-530, doi: 10.1099/ijs.0.066266-0.
78. Thompson, F. L., Thompson, C. C., Naser, S., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Munn, C., Bourne, D., and Swings, J. (2005) *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 913-917, doi: 10.1099/ijs.0.63370-0.
79. Pascual, J., Macian, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., and Pujalte, M. J. (2009) Description of *Enterovibrio nigricans* sp. nov., reclassification of *Vibrio calviensis* as *Enterovibrio calviensis* comb. nov. and emended description of the genus *Enterovibrio* Thompson et al. 2002, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 698-704, doi: 10.1099/ijs.0.001990-0.
80. Thompson, F. L., Hoste, B., Thompson, C. C., Goris, J., Gomez-Gil, B., Huys, L., De Los, P., and Swings, J. (2002) *Enterovibrio norvegicus* gen. nov., sp. nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae: a new member of the family Vibrionaceae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2015-2022, doi: 10.1099/00207713-52-6-2015.
81. URL: https://thefishsite.com/articles/nocardia-seriolae-a-chronic-problem.
82. Hurst, S., Rowedder, H., Michaels, B., Bullock, H., Jackobeck, R., Abebe-Akele, F., Durakovic, U., Gately, J., Janicki, E., and Tisa, L. S. (2015) Elucidation of the *Photorhabdus temperata* genome and generation of a transposon mutant library to identify motility mutants altered in pathogenesis, *J. Bacteriol.*, **197**, 2201-2216, doi: 10.1128/JB.00197-15.

LIPOXYGENASES OF BACTERIA AND PROTOZOA MAY CONTRIBUTE TO CELL-TO-CELL SIGNALING AND IMMUNE RESPONSE SUPPRESSION*

G. F. Kurakin[1], A. M. Samoukina[2], and N. A. Potapova[3,4]**

[1] *Tver State Medical University Ministry of Health of Russia, Department of Biochemistry and Laboratory Medicine, 170100 Tver, Russia; E-mail: kurackin-georgy@yandex.ru*

[2] *Tver State Medical University Ministry of Health of Russia, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, 170100 Tver, Russia; E-mail: anna_samoukina@mail.ru*

[3] *Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia; E-mail: nadezhdalpotapova@gmail.com*

[4] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119234 Moscow, Russia*

Received June 16, 2020
Revised July 22, 2020
Accepted July 22, 2020

Lipoxygenases are found in animals, plants, and fungi, where they are involved in a wide range of cell-to-cell signaling processes. The presence of lipoxygenases in a number of bacteria and protozoa has been also established, but their biological significance remains poorly understood. Several hypothetical functions of lipoxygenases in bacteria and protozoa have been suggested without experimental validation. The objective of our study was evaluating the functions of bacterial and protozoan lipoxygenases by evolutionary and taxonomic analysis using bioinformatics tools. Lipoxygenase sequences were identified and examined using BLAST, followed by analysis of constructed phylogenetic trees and networks. Our results support the theory on the involvement of lipoxygenases in the formation of multicellular structures by microorganisms and their possible evolutionary significance in the emergence of multicellularity. Furthermore, we observed association of lipoxygenases with the suppression of host immune response by parasitic and symbiotic bacteria including dangerous opportunistic pathogens.

Keywords: lipoxygenases, bacteria, protozoa, bioinformatics, phylogenetics, signaling, multicellularity, opportunistic pathogens

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1274 – 1284

УДК 577.12

РАЗЛИЧНЫЕ РОЛИ ИЗОФОРМ АКТИНА В ПРОЦЕССЕ ДЕЛЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК*

© 2020 Г.С. Шагиева[1], И.Б. Алиева[1,2], К. Шапонье[3], В.Б. Дугина[1]**

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

[2] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Россия*

[3] *Отделение патологии и иммунологии факультета медицины, Университет Женевы, 1205 Женева, Швейцария; электронная почта: Christine.Chaponnier@unige.ch*

Поступила в редакцию 23.06.2020
После доработки 22.07.2020
Принята к публикации 25.07.2020

В данной работе методом лазерной сканирующей микроскопии были исследованы распределение и функции бета- и гамма-цитоплазматических актинов на разных этапах деления неопухолевых эпителиальных клеток. Было показано, что бета- и гамма-актины пространственно разделены в ранней профазе, анафазе, телофазе и во время цитокинеза. Эксперименты с малыми интерференционными РНК показали, что снижение экспрессии как бета-актина, так и гамма-актина приводило к значительному сокращению популяции клеток. Снижение экспрессии бета-актина вызывало появление большого количества многоядерных клеток, что указывает на возможное нарушение цитокинеза в данных клетках. Подавление экспрессии гамма-актина приводило к уменьшению количества митозов. При митозе наблюдалась взаимозависимость между изоформами актина и системой микротрубочек: 1) снижение экспрессии гамма-актина приводило к нарушениям организации митотического веретена; 2) подавление полимеризации тубулина приводило к нарушениям реорганизации бета-актина: инкубация с колцемидом блокировала перенос коротких бета-актиновых полимеров из базальной области в кортикальную. Полученные результаты позволяют сделать заключение: для нормального деления клеток необходимы обе изоформы актина, но каждая изоформа дает свой специфический функциональный вклад в этот процесс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитоплазматический актин, митоз, микротрубочки, клеточное деление.

DOI: 10.31857/S0320972520090079

ВВЕДЕНИЕ

Актин и его регуляторные белки абсолютно необходимы для деления клеток. Актиновый цитоскелет эпителиальных клеток образуют две цитоплазматические изоформы актина и множество актин-связывающих белков, обеспечивающих формирование различных структур цитоскелета. Цитоплазматические бета- и гамма-актины (далее – бета- и гамма-актины) экспрессируются во всех клетках человека в разных пропорциях и отличаются только четырьмя аминокислотами на *N*-конце, расположенными в позициях 1, 2, 3 и 9 [1]. Ранее мы показали, что бета- и гамма-актиновые структуры специфически распределены и функционально различны в фибробластах и эпителиальных клетках человека. Сократительные стресс-фибриллы образованы преимущественно бета-актином, тогда как гамма-актин формирует сильно ветвящуюся кортикальную сеть в апикальной части клетки [2, 3].

При переходе клеток к делению все компоненты цитоскелета претерпевают значительные изменения. Взаимодействие актиновых структур и микротрубочек важно для регуляции формы и полярности клеток во время клеточного деления, от момента вхождения клеток в профазу до окончания цитотомии. Под клеточным делением мы понимаем всю М-фазу клеточного цикла, включая митоз (кариокинез) и цитокинез. Координация системы актиновых микрофиламентов и микротрубочек контролируется как многочисленными белками-регуляторами цитоскелета (например, Rho-ГТФазами), так и физическим взаимодействием разных филаментных систем (сшивки, заякоривание и меха-

Принятые сокращения: миРНК – малые интерференционные РНК, LSM – лазерная сканирующая микроскопия (laser scanning microscopy).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-174, 03.09.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ническое воздействие) [4]. Известно, что (1) взаимодействие актиновых филаментов с системой микротрубочек играет важную роль в сборке и поддержании трехмерной клеточной структуры, и (2) бета- и гамма-актины оказывают противоположное влияние на динамику и организацию микротрубочек [3]. Мы попытались выяснить влияют ли микротрубочки на функционирование структур бета- или гамма-актина, и наоборот, влияют ли актиновые структуры на микротрубочки в процессе митотического деления. Данное исследование было проведено на клетках эпителиальной линии HaCaT [5]. В качестве методов исследования распределения клеточных структур, образованных различными изоформами актина, и их функций на разных стадиях деления эпителиальных клеток были использованы лазерная сканирующая микроскопия (LSM), регуляция экспрессии актинов при помощи малых интерференционных РНК (миРНК), а также воздействие на динамику микротрубочек химическими ингибиторами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки, условия культивирования и экспериментальные воздействия. Клеточная линия HaCaT была получена от Л. Фонтао (отделение дерматологии, Университетская клиника Женевы, Швейцария). Клетки HaCaT являются самопроизвольно иммортализованными *in vitro* кератиноцитами из хирургического образца гистологически нормальной кожи человека [5]. Клетки содержали в среде DMEM («Gibco», Швейцария), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки («Seromed, Германия), 5 мМ глутаминовой кислоты («PanEco», Россия), при 37 °С в атмосфере 5% CO_2. Для экспериментов клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 до достижения ими конфлуэнтного монослоя, используя пластиковые флаконы, а затем рассаживали на стекла и культивировали в течение 3–8 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 для получения отдельно расположенных митотических клеток. После этого в среду культивирования добавляли один из перечисленных далее ингибиторов: (1) селективный ингибитор немышечного миозина II блеббистатин («Biomol International», США) использовали в концентрации 25 мкМ, инкубируя с ним клетки в течение 4 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2; (2) стабилизирующий микротрубочки препарат таксол (паклитаксел; «Sigma», США) – в концентрации 2 мкМ, инкубируя с ним клетки в течение 5 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2; (3) дестабилизирующий микротрубочки препарат колцемид (демеколцин; «Sigma», США) – в концентрации 0,1 мкг/мл, инкубируя с ним клетки в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2.

Антитела. В качестве первичных антител в работе использовали следующие антитела: антитела к цитоплазматическому бета-актину (мышиные mAb 4C2, IgG1, «Bio-Rad», США; AC-74, IgG2a, «Sigma», США), антитела к цитоплазматическому гамма-актину (мышиные mAb 2A3, IgG2b, «Bio-Rad», США; кроличьи pAbs AAL20), пан-актину (клон C4, «Chemicon», США), альфа-тубулину (клон DM1A, IgG1, «Sigma», США), кроличьи антитела против немышечного миозина IIA («Sigma», США), мышиные анти-Rac1 (mAb, IgG2b, «BD Transduction», США) и кроличьи анти-RhoA (mAb, «Epitomics/Abcam», США). Все первичные антитела использовали в разведении 1/100. В качестве вторичных антител использовали следующие антитела: козьи анти-мышиные IgG1, IgG2b и IgG2a, конъюгированные с Alexa488, Alexa594 и Alexa647 («Southern Biotechnology Associates Inc.», США). Конъюгированные с TRITC или Cy-5 козьи анти-кроличьи антитела («Jackson Immuno-Research Laboratories Inc.», США). Все вторичные антитела использовали в разведении 1/500. DRAQ5 («Biostatus», Великобритания) и DAPI («Sigma», США) применялись для выявления ДНК.

Белковый иммуноблоттинг. Клетки с пластиковых культуральных чашек экстрагировали холодным буфером для образцов (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2%-ный додецилсульфат натрия (SDS), 10% (*v/v*) глицерин, 50 мМ дитиотреитол (DTT), 0,01% бромфеноловый синий, коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma», США). Лизаты разделяли в 10%-ном SDS полиакриламидном геле и переносили на поливинилиденфторидную мембрану («Amersham GE Healthcare», США). После блокирования неспецифического связывания бычьим сывороточным альбумином мембраны инкубировали со специфическими антителами. Мы использовали альфа-тубулин в качестве контроля загрузки. Мембраны инкубировали со вторичными антителами, связанными с пероксидазой хрена («Amersham GE Healthcare», США), в разведении 1/30 000. Мембраны были обработаны реагентами ECL («Amersham GE Healthcare», США) в соответствии с протоколом производителя. Люминесцентное излучение фиксировали при помощи светочувствительной фотографической плёнки. Полученные пленки сканировали и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ 1,37C (NIH, http://rsb.info.nih.gov/ij/). Оценку разницы относительного количества белка проводили при помощи *U*-критерия Манна–Уитни по результатам пяти независимых экспериментов.

Иммунофлуоресцентная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Для иммунофлуоресцентного анализа клетки культивировали на покровных стеклах, промывали DMEM, содержащей 20 мМ HEPES, при 37°C в течение 5 мин, фиксировали в течение 15 мин 1%-ным параформальдегидом в среде DMEM с 20 мМ HEPES при комнатной температуре.

Затем клетки фиксировали/пермеабилизировали холодным MeOH при –20 °C в течение 5 мин для последующей инкубации с антителами. Условия фиксации, используемые в этом исследовании, имеют решающее значение для лучшей доступности *N*-конца изоформ актина [2]. Для иммунофлуоресцентного выявления белков RhoA и Rac1 клетки фиксировали, используя холодную 10% трихлоруксусную кислоту (–20° C) в течение 15 мин. Анализ проводили с помощью конфокального микроскопа LSM510, Zeiss («Zeiss», Германия), снабженного масляными иммерсионными объективами (Plan-Neofluar 63×/1.4 и Plan-Fluar 100×/1.45, Zeiss) («Zeiss», Германия). Полученные изображения (одиночные оптические срезы толщиной ~1 мкм) были обработаны с использованием программного обеспечения конфокального микроскопа LSM510 Zeiss («Zeiss», Германия). Количественные измерения клеточной площади проводили с использованием программного обеспечения конфокального микроскопа LSM510 Zeiss («Zeiss», Германия), анализируя данные, полученные в серии из трех независимых экспериментов, по меньшей мере для 20 клеток для каждого экспериментального условия. Интенсивность флуоресцентного окрашивания бета-актина анализировали в программном обеспечении ImageJ 1,37C при помощи инструмента «множественные точки» (multi-point) в отдельном цветовом канале. Для каждой клетки получали средние значения интенсивности множественных измерений порядка 30 точек на кортикальную область или цитозольные скопления актина. Результаты представлены в виде среднего по 10–15 клеткам на каждое условие по двум типам локализации ± стандартная ошибка среднего.

Последовательности миРНК, использованные в работе

Название миРНК	5′–3′ последовательность миРНК
бета-актин миРНК1	AATGAAGATCAAGATCATTGC
бета-актин миРНК2	TAGCATTGCTTTCGTGTAAAT
бета-актин миРНК3	CAAATATGAGATGCATTGTTA
гамма-актин миРНК1	AAGAGATCGCCGCGCTGGTCA
гамма-актин миРНК2	CAGCAACACGTCATTGTGTAA

Трансфекция миРНК. Последовательности миРНК к бета-цитоплазматическому актину человека (NM_001101) – бета-актин миРНК1, бета-актин миРНК2, бета-актин миРНК3, и к гамма-цитоплазматическому актину человека (NM_001614) – гамма-актин миРНК1 и гамма-актин миРНК2 («Qiagen», Швейцария) представлены в таблице.

Клетки трансфицировали 50–100 нМ миРНК с использованием Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США). Эффективность трансфекции (≥90%) оценивали с использованием BLOCK-iT ™ («Invitrogen», США). Клетки HaCaT анализировали на 3-й день после трансфекции миРНК. Количественную оценку клеточных популяций после воздействия миРНК проводили путем анализа общего количества клеток в суспензии после снятия с субстрата. Для оценки доли многоядерных клеток вели подсчет количества таких клеток среди 100 клеток популяции для каждого экспериментального условия; для оценки доли митозов рассчитывали количество митотических клеток на 100 клеток популяции.

Статистический анализ. Результаты по меньшей мере трех независимых экспериментов представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Межгрупповые различия анализировали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Значения $p < 0{,}001$ (***), $p < 0{,}01$ (**) и $p < 0{,}05$ (*) считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внутриклеточная локализация бета- и гамма-актина на разных стадиях клеточного деления. Тройной иммунофлуоресцентный анализ распределения цитоскелетных структур бета- и гамма-актина, а также альфа-тубулина в клетках HaCaT, находящихся на разных стадиях митоза и во время цитокинеза, позволил установить, что системы, образованные двумя изоформами актина по-разному локализованы в делящихся эпителиальных клетках.

В ранней профазе структуры, образованные цитоплазматическими актинами, были расположены полярно аналогично интерфазным клеткам [2] – бета-актин был организован в вентральные фибриллы, а гамма-актин формировал дорзальную сеть (рис. 1, *а*). Измерения интенсивности флуоресценции бета-актина в прометафазе выявили лишь незначительное преобладание в кортикальном слое (158,43 ± 16,9) по сравнению с цитоплазмой (132,6 ± 15,8). В метафазе оба актина концентрировались в кортикальном слое клеток (рис. 1, *б* и *г*). В анафазе бета-актин концентрировался в кортикальном слое эквато-

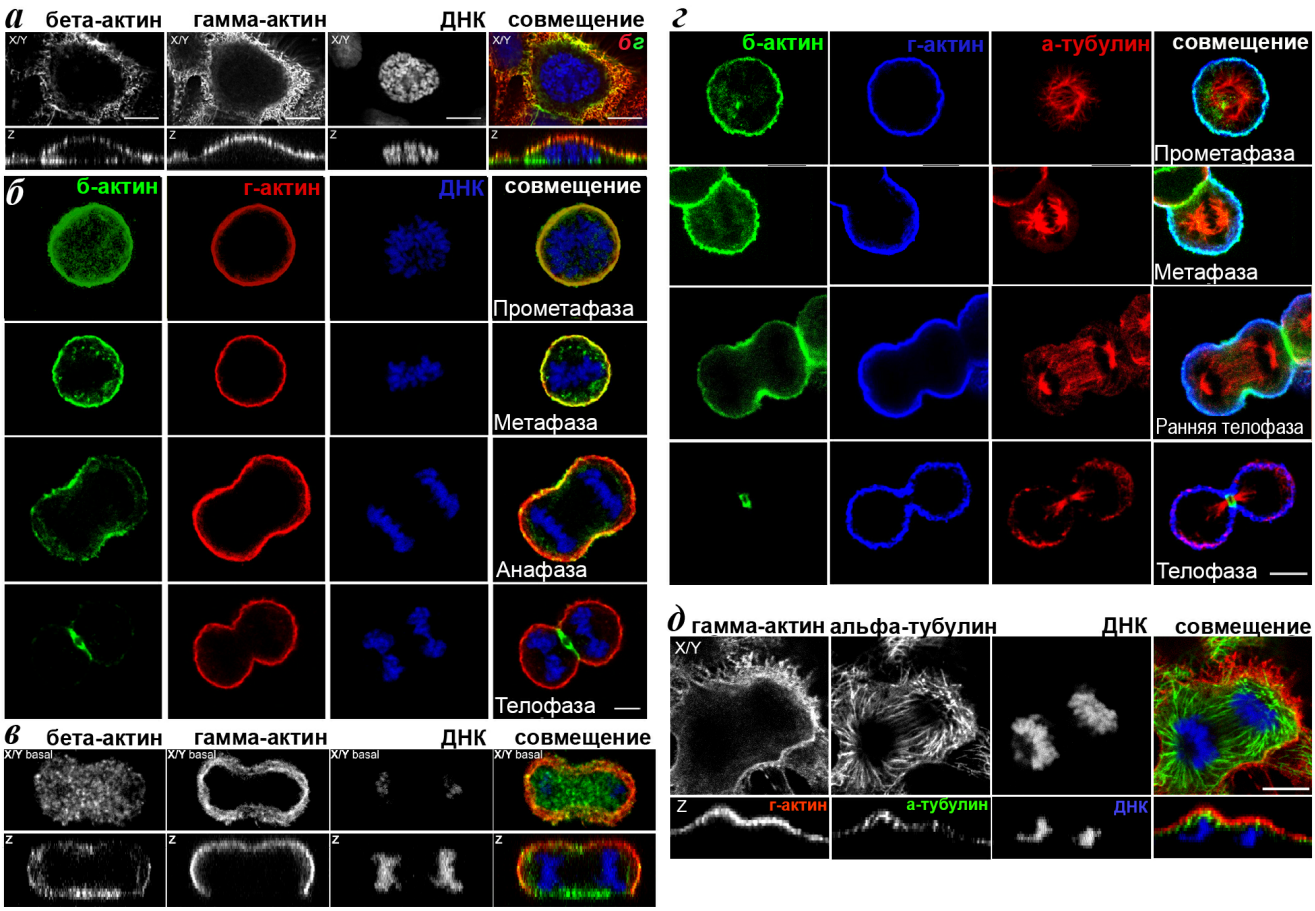


Рис. 1. LSM. *а* – Ранняя профаза в клетках HaCaT, X/Y и Z – оптические срезы. Бета-актин (зеленый), гамма-актин (красный), ДНК (синий) – на крайнем правом изображении. *б* – Распределение структур цитоплазматических актинов во время митоза (профазы, метафазы, анафазы, телофазы) и цитокинеза в клетках HaCaT: бета-актин (зеленый), гамма-актин (красный), ДНК (синий). *в* – Локализация цитоплазматических актинов на уровне базального оптического среза в митотической клетке HaCaT: бета-актин (зеленый), гамма-актин (красный), ДНК (синий) на изображении с объединенными цветовыми каналами. *г* – Распределение структур цитоплазматических актинов и тубулина во время митоза (прометафаза, метафаза, ранняя телофаза, телофаза) и цитокинеза в HaCaT: бета-актин (зеленый), гамма-актин (синий), альфа-тубулин (красный). *д* – Локализация гамма-актина (красный), альфа-тубулина (зеленый) и ДНК (синий) в анафазных клетках HaCaT. Оптический срез X/Y – верхний ряд, Z – нижний ряд. Масштаб – 5 мкм. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

риальной зоны, где в дальнейшем он участвовал в образовании сократительного кольца во время телофазы и цитокинеза (рис. 1, *б* и *г*). В течение деления бета-актин также формировал вентральные пучки в зоне контактов клетки с субстратом (рис. 1, *а* и *в*). Гамма-актин находился в кортикальной сети во время всех митотических фаз и цитокинеза (рис. 1). Взаимное расположение цитоплазматических актинов и альфа-тубулина во время митотических фаз и цитокинеза в HaCaT представлено на рис. 1, *в* и *г*.

Участие бета-актина в формировании сократительного кольца. Блеббистатин является ингибитором немышечного миозина II, который блокирует взаимодействие миозина II с актином [6]. Мы исследовали влияние блеббистатина на распределение цитоплазматических актинов в эпителиальных клетках HaCaT. В большинстве животных клеток процесс разделения цитоплазмы, цитокинез, начинается в анафазе и заканчивается вскоре после телофазы [7]. Блеббистатин подавляет активность сократительного кольца, не нарушая при этом митоз (кариокинез) [8]. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что в анафазных и телофазных клетках после инкубации с блеббистатином концентрация бета-актина в экваториальной области снижена по сравнению с контролем (рис. 2, *а* и *б*). Локализация гамма-актина осталась неизменной (данные не показаны).

Малые Rho-ГТФазы являются регуляторами организации как системы микротрубочек, так и

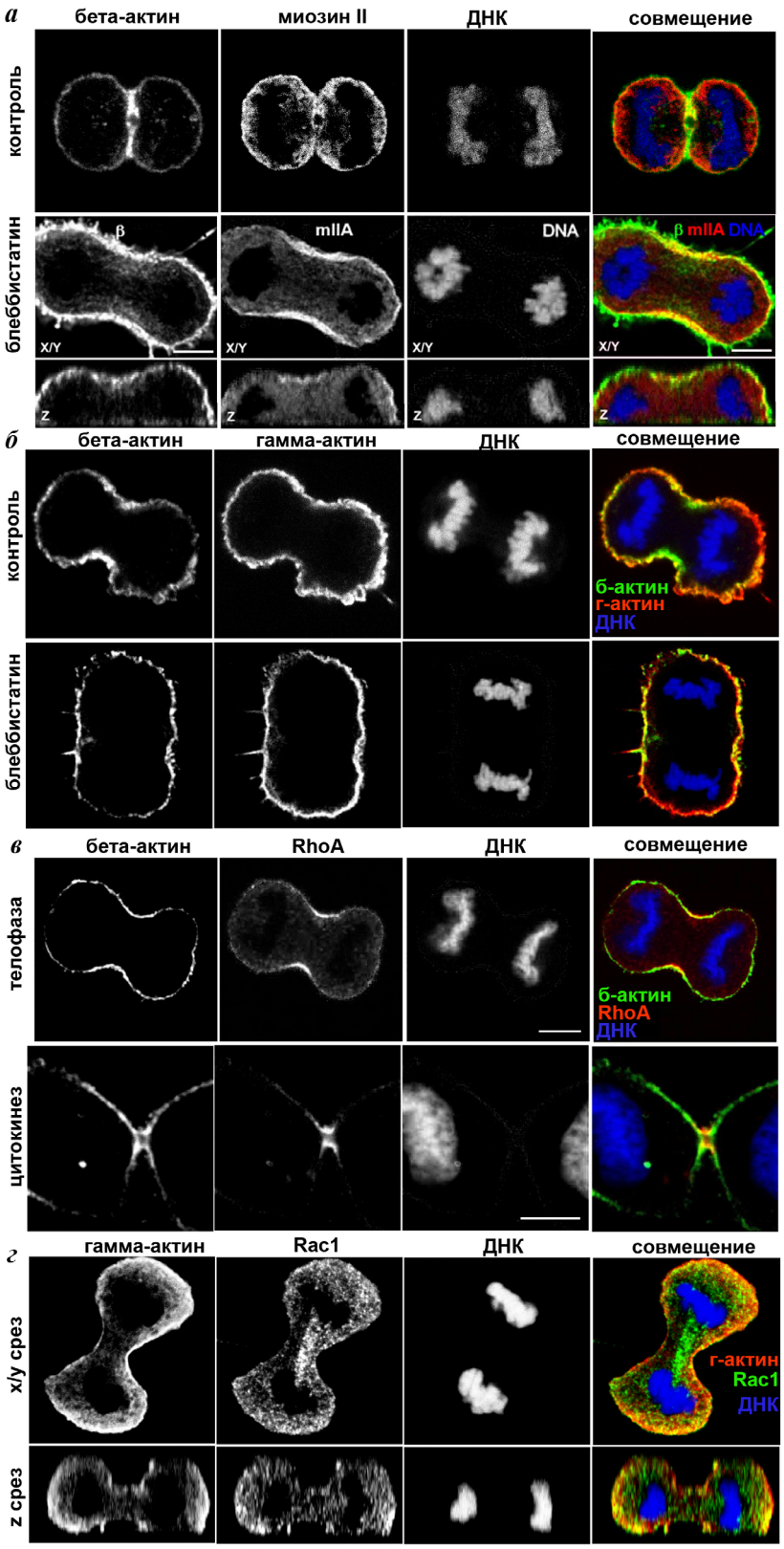


Рис. 2. LSM. *а* – Бета-актин (зеленый), миозин IIA (красный) и ДНК (синий) в HaCaT, после инкубации с блеббистатином, телофаза/цитокинез. *б* – Бета-актин (зеленый), гамма-актин (красный) и ДНК (синий) в HaCaT, после инкубации с блеббистатином, анафаза/цитокинез. *в* – RhoA (красный), бета-актин (зеленый) и ДНК (синий) во время телофазы/цитокинеза в HaCaT. *г* – Гамма-актин (красный), Rac1 (зеленый) и ДНК (синий) в клетках HaCaT, телофаза. Оптические срезы X/Y и Z. Масштаб – 5 мкм

актинового цитоскелета [9]. Известно также, что сборка сократительного кольца происходит при пространственно-временной регуляции малыми ГТФазами [10]. Для выявления возможной избирательности Rho-ГТФаз по отношению к изоформам актина в работе проанализировали локализацию RhoA и Rac1 в телофазных клетках HaCaT. Мы обнаружили концентрацию RhoA в экваториальной области и сократительном кольце в телофазе/цитокинезе, что коррелирует с расположением бета-актина, но не гамма-актина (рис. 2, *в*). Другая Rho-ГТФаза, Rac1, была равномерно распределена в цитоплазме с концентрацией в кортикальном слое, особенно в области полюсов телофазных клеток, где наблюдалось накопление и гамма-актина (рис. 2, *г*).

Снижение экспрессии бета- или гамма-актина угнетает деление эпителиальных клеток и вызывает различные дефекты митоза. Учитывая сегрегацию изоформ актина в митотических клетках HaCaT, мы провели трансфекцию миРНК к бета-актину или гамма-актину, чтобы оценить вклад каждого из цитоплазматических актинов в прогрессию митоза. Снижение количества бета-актина через 72 ч после трансфекции составило 37,7 ± 4,3%, что сопровождалось небольшим увеличением (на 9,5% ± 5,2%) количества гамма-актина. Снижение экспрессии гамма-актина с помощью миРНК составило 35,5 ± 5,8%, экспрессия бета-актина при этом практически не изменилась (рис. 3, *а*).

Избирательное подавление изоформ цитоплазматических актинов в HaCaT приводило к значительным изменениям пролиферации *in vitro*, но снижение экспрессии каждой изоформы по-разному влияло на процесс деления. При супрессии как бета-актина, так и гамма-актина число клеток на 3-и сутки после трансфекции было ниже по сравнению с контролем: 36,7 ± ± 2,53% для миРНК к бета-актину и 47,5 ± ± 8,2% – для миРНК к гамма-актину (рис. 3, *б*). В экспериментах с подавлением экспрессии бета-актина наблюдалось увеличение площади клеток в метафазе, нарушения цитокинеза и появление многоядерных клеток. Площадь клеток в метафазе в контроле составила 214,149 ± 31,009, с миРНК к бета-актину – 496,112 ± 68,265, с миРНК к гамма-актину – 157,043 ± 14,652 мкм^2. Снижение экспрессии бета-актина приводило к появлению значительного количества двуядерных клеток – 29 ± 2% по сравнению с 2% как в контроле, так и в клетках со сниженной экспрессией гамма-актина (рис. 3, *в*). Подавление экспрессии гамма-актина в HaCaT приводило к снижению доли митотических клеток в популяции: их количество было в 3,4 раза меньше на второй день после трансфекции и в 2,2 раза меньше на третий день после трансфекции по сравнению с контролем. Динамика снижения митотического индекса в результате подавления экспрессии бета-актина была значительно менее выраженной: доля митотических клеток была в 1,8 раза ниже, чем в контроле, на 2-е сутки после трансфекции, а на 3-и сутки – была такой же, как в контрольных клетках. В клетках с супрессией гамма-актина мы обнаружили задержку в формировании веретена деления (данные не показаны), блеббинг кортекса и различные ядерные деформации: сильная асимметрия организации хромосом (рис. 3, *г*) и компактизация ядер.

Во время интерфазы микротрубочки образуют трехмерную радиальную систему, а их плюс-концы находятся близко к кортикальному слою актина [3]. Организация астральных микротрубочек и микротрубочек веретена в митотических контрольных клетках и клетках с миРНК к бета-актину была схожей, однако снижение экспрессии гамма-актина привело к нарушению системы микротрубочек, образующих веретено деления (рис. 3, *г*).

Взаимосвязь микротрубочек и цитоплазматических актинов. Взаимодействие актиновых филаментов с системой микротрубочек играет важную роль в сборке и поддержании трехмерной структуры клеток. Таксол – препарат, стабилизирующий микротрубочки, – противоопухолевый агент растительного происхождения. Таксол стехиометрически и специфически связывается с субъединицами бета-тубулина в димерах тубулина, что приводит к образованию стабильных микротрубочек [11]. Стабилизация микротрубочек таксолом не нарушала локализацию бета- и гамма-актинов в кортексе в метафазных клетках, при этом сохранялась связь микротрубочек с кортексом (рис. 4, *а*). Препарат, обладающий противоположным действием – колцемид – ингибирует полимеризацию микротрубочек и образование митотического веретена, блокируя клетки на стадии метафазы [12,13]. После удаления колцемида из среды культивирования происходила реполимеризация микротрубочек и образование митотического веретена. Через 1 ч после удаления колцемида небольшие бета-актиновые фибриллы наблюдались на базальном уровне клетки и вблизи микротрубочек веретена (рис. 4, *б*). Через 4 ч после удаления колцемида бета-актин, помимо цитоплазматической и базальной локализации, вновь обнаруживался в клеточном кортексе. Воздействие колцемида не влияло на локализацию гамма-актина (рис. 4, *б*). Чтобы проанализировать распределение бета-актина после инкубации с колцемидом с последующей отмывкой, а также после инкубации с таксолом, мы измерили интенсивность

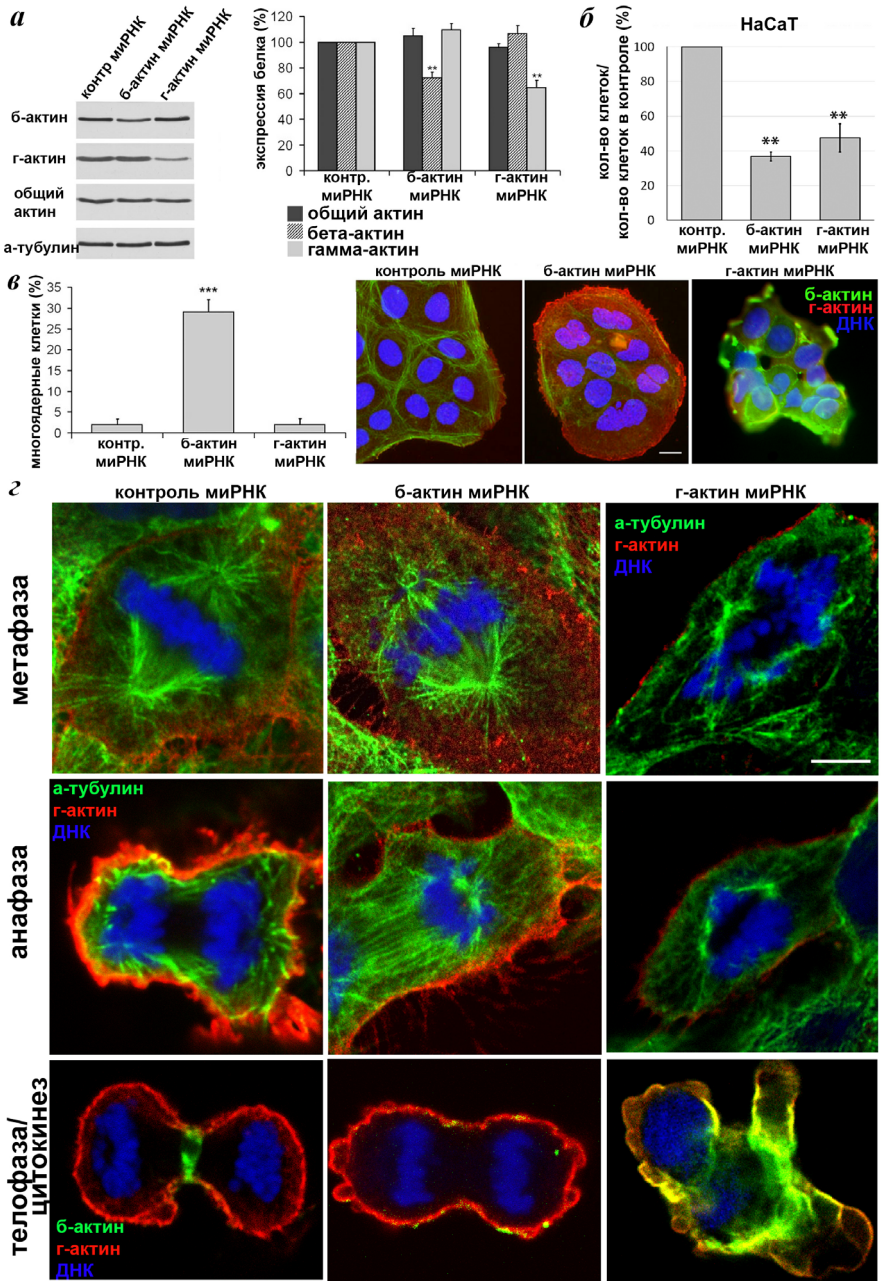


Рис. 3. LSM. *а* – Снижение количества бета- и гамма-актина с помощью миРНК. Белковый иммуноблоттинг. *б* – Влияние миРНК к бета-актину или гамма-актину на рост популяции клеток HaCaT. *в* – Количество многоядерных клеток HaCaT с миРНК к бета-актину увеличено по сравнению с контролем и миРНК к гамма-актину. Масштаб 10 мкм. *г* – Метафаза, анафаза и телофаза/цитокинез в клетках HaCaT со сниженной экспрессией бета- или гамма-актина. Два верхних ряда: гамма-актин (красный), альфа-тубулин (зеленый), ДНК (синий). Нижний ряд: гамма-актин (красный), бета-актин (зеленый), ДНК (синий). Масштаб – 5 мкм

флуоресцентного окрашивания бета-актина в кортексе и цитоплазме. В контрольных метафазных клетках интенсивность флуоресцентного окрашивания бета-актина в кортексе составляла 237,417 ± 12,257, в цитоплазме – 63,861 ± ± 18,317. Через 3 ч после удаления колцемида интенсивность флуоресцентного окрашивания бета-актина в кортексе составила 136,259 ± ± 12,836, в цитоплазме – 92,308 ± 22,885. После инкубации с таксолом (5 ч) интенсивность флуоресценции бета-актина в кортексе составила 198,15 ± 14,74, в цитоплазме – 153,24 ± 20,48.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенных нами исследований позволили выявить выраженные различия в ло-

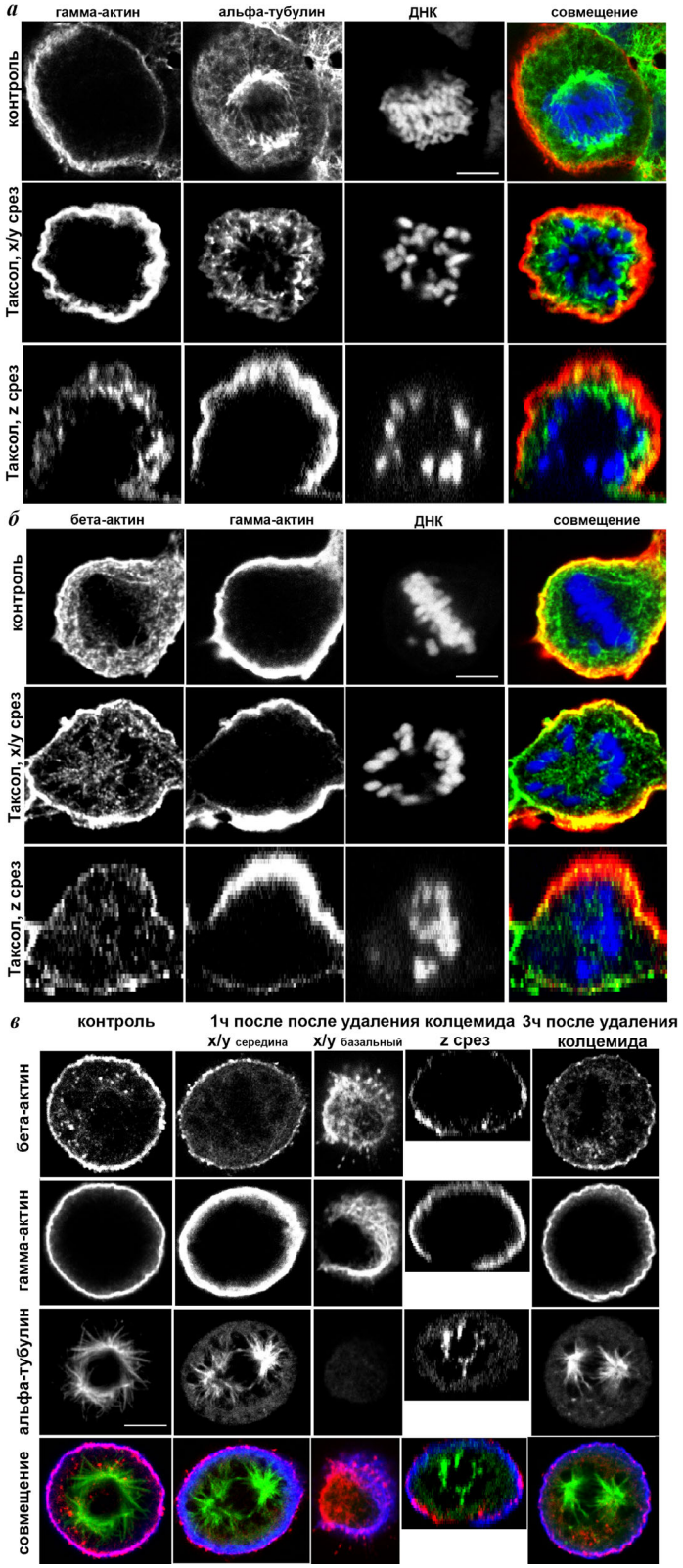


Рис. 4. LSM. *а* – Влияние таксола на распределение цитоплазматических актинов в HaCaT при митозе. Альфа-тубулин (зеленый), гамма-актин (красный), ДНК (синий); *б* – бета-актин (зеленый), гамма-актин (красный), ДНК (синий) после инкубации с таксолом клеток HaCaT; *в* – цитоплазматические актины и альфа-тубулин в клетках HaCaT после инкубации с колцемидом, по сравнению с одним/четырьмя часами после удаления колцемида. Альфа-тубулин (зеленый), бета-актин (красный), гамма-актин (синий). Масштаб – 5 мкм

кализации клеточных структур, образованных бета- и гамма-цитоплазматическими изоформами актина, на разных стадиях митотического деления, включая цитокинез, эпителиальных клеток HaCaT.

Гамма-актин находился в кортексе в течение всех фаз митоза и во время цитокинеза и не участвовал в формировании сократительного кольца. Снижение экспрессии гамма-актина вызывало изменение формы митотических клеток и кортикальный блеббинг. Ранее было показано, что микроинъекции антител к гамма-актину (но не к бета-актину) также вели к значительным нарушениям формы ооцитов, деформациям кортекса и блеббингу [14]. Бета-актин формировал базальные фибриллы в ранней профазе, концентрировался в кортикальной области в метафазе, концентрировался в экваториальной зоне в анафазе и формировал сократительное кольцо в телофазе и цитокинезе. Участие бета-актина в формировании сократительного кольца согласуется с нашими предыдущими данными [2] и исследованиями митоза в опухолевых клетках SH-EP и HeLa [15, 16]. Фибриллы бета-актина локализовались в базальной части клеток, поэтому мы предполагаем, что именно бета-актин обеспечивал адгезию клеток к субстрату во время митоза.

Существует несколько ключевых событий митоза, где участие актина играет важную роль. Одним из таких событий является разделение центросом. Актиновый цитоскелет необходим для формирования веретена деления [17]. Нарушение функционирования акто-миозиновых структур, деполимеризация актиновых филаментов приводят к ошибкам разделения центросом и сборки веретена [18–20]. Появляется все больше доказательств того, что при мейотическом делении актин участвует не только в передвижении и позиционировании веретена, но также защищает ооциты от ошибок сегрегации хромосом, приводящих к анеуплоидии [21]. Ранее мы продемонстрировали селективное взаимодействие микротрубочек и цитоплазматического гамма-актина (но не бета-актина), опосредованное плюс-концевым белком микротрубочек EB1 в эпителиальных клетках опухолевых линий [3]. В данной работе мы показали, что даже умеренное снижение гамма-актина (но не бета-актина) вызывало нарушения структуры веретена деления в эпителиальных клетках при митозе. Ранее было продемонстрировано, что частичная супрессия гамма-актина усиливает амплификацию центросом в опухолевых клетках и вызывает значительную задержку на стадии прометафазы/метафазы. Длительная задержка в прометафазе/метафазе сопровождалась появлением митотических дефектов, связанных с расхождением хромосом и повышением частоты аномалий митотического веретена в клетках со сниженной экспрессией гамма-актина [15]. С другой стороны, оказалось, что организация системы микротрубочек также может влиять на систему микрофиламентов. Наши данные дают основание полагать, что транспорт бета-актина из базальной части клетки в кортекс зависит от функционально нормальной системы микротрубочек.

В конце митоза в клетке происходит реорганизация актиновых структур, образуется сократительное кольцо, разделяющее дочерние клетки и необходимое для прохождения цитокинеза. Сократительное кольцо представляет собой систему актиновых и миозиновых филаментов, регулируемую RhoA-ГТФазой, которая создает силу, необходимую для деформации плазматической мембраны и образования перетяжки между дочерними клетками [22]. Ингибитор миозина II, блеббистатин, снижал концентрацию бета-актина в экваториальной области, но не нарушал сеть гамма-актина в анафазных клетках HaCaT. В клетках со сниженным количеством бета-актина мы наблюдали нарушения цитокинеза, и, как следствие, высокий процент многоядерных клеток. Недавно было показано, что стабилизация и организация клеточной перетяжки обеспечивается, в частности, концентрацией бета-актиновых фибрилл в зоне протекания цитокинеза [16]. Также следует отметить, что бета-актиновые пучки собираются непосредственно в области перетяжки с помощью анилин-зависимого пути. Анилин необходим для поддержания активного миозина в экваториальной плоскости во время цитокинеза, вероятно, он функционирует в качестве каркасного белка, связывая RhoA с компонентами сократительного кольца – актином и миозином [23, 24]. В асинхронной популяции HeLa после 24 ч действия миРНК к анилину 40–50% клеток являются двуядерными [25].

Образование стресс-фибрилл и ламеллиподий происходит под контролем малых ГТФаз, RhoA и Rac1 соответственно [26]. Сборка и функционирование сократительного кольца регулируется RhoA [27]. Накопление RhoA в экваториальной области клетки перед началом цитокинеза было описано ранее [25, 28]. Мы наблюдали аналогичное повышение концентрации RhoA в митотических неопухолевых клетках HaCaT. Показано, что RhoA активирует ROCK (Rho-associated protein kinase), что, в свою очередь, увеличивает силу сокращения за счет фосфорилирования легкой цепи миозина [29]. Воздействие селективного ингибитора ROCK, Y-27632, приводило к разрушению пуч-

ков бета-актина, не нарушая организацию сети гамма-актиновых микрофиламентов [2]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что белок RhoA необходим для регуляции бета-актиновых сократимых структур, но не гамма-актиновой системы микрофиламентов.

Известно, что малые ГТФазы семейства Rho участвуют в передаче сигналов от мембранных рецепторов к цитоскелету и адгезионным контактам. ГТФаза Rac1 способствует сборке актина на периферии клеток с образованием ламеллиподий и раффлов [30]. Ингибитор Rac1, NSC23766, подавляет образование протрузий, вызывает исчезновение ламелл и ламеллиподий, нарушает кортикальную сеть гамма-актина и усиливает образование бета- и гамма-актиновых стресс-фибрилл в интерфазных клетках [2]. В ооцитах млекопитающих Rac1 регулирует стабильность мейотического веретена и его «заякоривание» в клеточном кортексе [31]. Во время телофазы в клетках HaCaT белок Rac1 был равномерно распределен в цитоплазме с некоторой концентрацией на периферии клетки, в районе митотических полюсов его локализация совпадала с расположением гамма-актина. Учитывая данные наблюдения и наши предыдущие результаты [32, 33], можно предположить, что Rac1 влияет на гамма-актиновую сеть опосредованно, через киназы ERK1/2, и управляет движением ведущего края при расхождении дочерних клеток в цитокинезе.

В данной работе впервые было продемонстрировано распределение цитоплазматических изоформ актина на всех стадиях митотического деления, а также показана функциональная взаимосвязь бета- и гамма-актиновых структур с системой микротрубочек в неопухолевых эпителиальных клетках. Подводя итоги, оба цитоплазматических актина необходимы для нормального деления клеток, но особый интерес представляет индивидуальный вклад каждой изоформы в этапы этого процесса, что, несомненно, требует дальнейшего изучения на различных клеточных моделях.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-29-09082 и 18-34-00047) и Программы развития МГУ (PNR 5.13).

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. Ampe, C., and Van Troys, M. (2017) Mammalian actins: isoform-specific functions and diseases, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **235**, 1-37, doi: 10.1007/164_2016_43.
2. Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clement, S., Chaponnier, C., Clément, S., and Chaponnier, C. (2009) Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity, *J. Cell Sci.*, **122**, 2980-2988, doi: 10.1242/jcs.041970.
3. Dugina, V., Alieva, I., Khromova, N., Kireev, I., Gunning, P. W., and Kopnin, P. (2016) Interaction of microtubules with the actin cytoskeleton via cross-talk of EB1-containing +TIPs and γ-actin in epithelial cells, *Oncotarget*, **7**, 72699-72715, doi: 10.18632/oncotarget.12236.
4. Dogterom, M., and Koenderink, G. H. (2019) Actin–microtubule crosstalk in cell biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 38-54, doi: 10.1038/s41580-018-0067-1.
5. Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.*, **106**, 761-771, doi: 10.1083/jcb.106.3.761.
6. Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., and Sellers, J. R. (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II, *J. Biol. Chem.*, **279**, 35557-35563, doi: 10.1074/jbc.M405319200.
7. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008) Cytokinesis, in *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edn., Garland Science, New York, pp. 1092-1093.
8. Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor, *Science*, **299**, 1743-1747, doi: 10.1126/science.1081412.
9. Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology, *Nature*, **420**, 629-635, doi: 10.1038/nature01148.
10. Bement, W. M., Miller, A. L., and Von Dassow, G. (2006) Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays, *BioEssays*, **28**, 983-993, doi: 10.1002/bies.20477.
11. Xiao, H., Verdier-Pinard, P., Fernandez-Fuentes, N., Burd, B., Angeletti, R., Fiser, A., Horwitz, S. B., and Orr, G. A. (2006) Insights into the mechanism of microtubule stabilization by taxol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10166-10173, doi: 10.1073/pnas.0603704103.
12. Borisy, G. G., and Taylor, E. W. (1967) The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus, *J. Cell Biol.*, **34**, 535-548, doi: 10.1083/jcb.34.2.535.
13. Borisy, G. G., and Taylor, E. W. (1967) The mechanism action of colchicine. Binding of colchincine-3H to cellular protein, *J. Cell Biol.*, **34**, 525-533, doi: 10.1083/jcb.34.2.525.
14. Brockmann, C., Huarte, J., Dugina, V., Challet, L., Rey, E., Conne, B., Swetloff, A., Nef, S., Chaponnier, C., and Vassalli, J.-D. (2011) Beta- and gamma-cytoplasmic actins are required for meiosis in mouse oocytes, *Biol. Reprod.*, **85**, 1025-1039, doi: 10.1095/biolreprod.111.091736.
15. Po'uha, S. T., and Kavallaris, M. (2015) Gamma-actin is involved in regulating centrosome function and mitotic progression in cancer cells, *Cell Cycle*, **14**, 3908-3919, doi: 10.1080/15384101.2015.1120920.
16. Chen, A., Arora, P. D., McCulloch, C. A., and Wilde, A. (2017) Cytokinesis requires localized β-actin filament pro-

duction by an actin isoform specific nucleator, *Nat. Commun.*, **8**, 1530, doi: 10.1038/s41467-017-01231-x.
17. Sandquist, J. C., Kita, A. M., and Bement, W. M. (2011) And the dead shall rise: actin and myosin return to the spindle, *Dev. Cell*, **21**, 410-419, doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.018.
18. Uzbekov, R., Kireyev, I., and Prigent, C. (2002) Centrosome separation: respective role of microtubules and actin filaments, *Biol. Cell*, **94**, 275-288, doi: 10.1016/s0248-4900(02)01202-9.
19. Lancaster, O., LeBerre, M., Dimitracopoulos, A., Bonazzi, D., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Picone, R., Duke, T., Piel, M., and Baum, B. (2013) Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation, *Dev. Cell*, **25**, 270-283. doi: 10.1016/j.devcel.2013.03.014.
20. Rosenblatt, J., Cramer, L. P., Baum, B., and McGee, K. M. (2004) Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly, *Cell*, **117**, 361-372, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00341-1.
21. Mogessie, B., and Schuh, M. (2017) Actin protects mammalian eggs against chromosome segregation errors, *Science*, **357**, eaal1647, doi: 10.1126/science.aal1647.
22. Jordan, S. N., and Canman, J. C. (2012) Rho GTPases in animal cell cytokinesis: an occupation by the one percent, *Cytoskeleton (Hoboken)*, **69**, 919-930, doi: 10.1002/cm. 21071.
23. Chen, X., Wang, K., Svitkina, T., and Bi, E. (2020) Critical roles of a RhoGEF-anillin module in septin architectural remodeling during cytokinesis, *Curr. Biol.*, **30**, 1477-1490.e3, doi: 10.1016/j.cub.2020.02.023.
24. Svitkina, T. (2018) The actin cytoskeleton and actin-based motility, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, a018267, doi: 10.1101/cshperspect.a018267.
25. Piekny, A. J., and Glotzer, M. (2008) Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis, *Curr. Biol.*, **18**, 30-36, doi: 10.1016/j.cub.2007. 11.068.
26. Ridley, A. J., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors, *Cell*, **70**, 389-399, doi: 10.1016/0092-8674(92)90163-7.
27. Wagner, E., and Glotzer, M. (2016) Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage, *J. Cell Biol.*, **213**, 641-649, doi: 10.1083/jcb.201603025.
28. Takaishi, K., Sasaki, T., Kameyama, T., Tsukita, S., Tsukita, S., and Takai, Y. (1995) Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell–cell adhesion sites and cleavage furrows, *Oncogene*, **11**, 39-48.
29. Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Inagaki, M. (2000) Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow, *Oncogene*, **19**, 6059-6064, doi: 10.1038/sj.onc.1203987.
30. Hall, A., and Nobes, C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **355**, 965-970, doi: 10.1098/rstb.2000.0632.
31. Halet, G., and Carroll, J. (2007) Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes, *Dev. Cell*, **12**, 309-317, doi: 10.1016/j.devcel.2006.12.010.
32. Dugina, V., Khromova, N., Rybko, V., Blizniukov, O., Shagieva, G., Chaponnier, C., Kopnin, B., and Kopnin, P. (2015) Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms, *Oncotarget*, **6**, 14556-14571, doi: 10.18632/oncotarget.3989.
33. Dugina, V., Shagieva, G., Khromova, N., and Kopnin, P. (2018) Divergent impact of actin isoforms on cell cycle regulation, *Cell Cycle*, **17**, 2610-2621, doi: 10.1080/15384101.2018.1553337.

DIVERGENT IMPACT OF ACTIN ISOFORMS ON CELL DIVISION OF EPITHELIAL CELLS*

G. S. Shagieva[1], I. B. Alieva[1,2], C. Chaponnier[3], and V. B. Dugina[1]**

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru*

[2] *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency (FMBA), 119435 Moscow, Russia*

[3] *Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Geneva, 1205 Geneva, Switzerland; E-mail: Christine.Chaponnier@unige.ch*

Received June 23, 2020
Revised July 22, 2020
Accepted July 25, 2020

We investigated distribution and functions of beta- and gamma-cytoplasmic actins (CYAs) at different stages of non-neoplastic epithelial cell division using laser scanning microscopy (LSM). Here, we demonstrated that beta- and gamma-CYAs are spatially segregated in the early prophase, anaphase, telophase, and cytokinesis. Small interfering RNA (siRNA) experiments revealed that in both beta-CYA- and gamma-CYA-depleted cells, the number of cells was significantly reduced compared with the siRNA controls. Beta-CYA depletion resulted in an enlargement of the cell area in metaphase and high percentage of polynuclear cells compared with the siRNA control, indicating a potential failure of cytokinesis. Gamma-CYA depletion resulted in a reduced percentage of mitotic cells. We also observed the interdependence between the actin isoforms and the microtubule system in mitosis: (i) a decrease in the gamma-CYA led to impaired mitotic spindle organization; (ii) suppression of tubulin polymerization caused impaired beta-CYA reorganization, as incubation with colcemid blocked the transfer of short beta-actin polymers from the basal to the cortical compartment. We conclude that both actin isoforms are essential for proper cell division, but each isoform has its own specific functional role in this process.

Keywords: cytoplasmic actin, mitosis, microtubules, cell division

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1285 – 1293

УДК 577.11

Tn АНТИГЕН В СОСТАВЕ МОЛЕКУЛЫ CD44 КАК НОВЫЙ БИОМАРКЕР ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С АБЕРРАНТНЫМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ*

© 2020 М.Л. Шувалова[1], А.Т. Копылов[2], Д.В. Мазуров[1], А.В. Пичугин[1], Н.В. Бовин[3], А.В. Филатов[1,4]**

[1] *ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522 Москва, Россия; электронная почта: avfilat@yandex.ru*

[2] *Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия*

[3] *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

[4] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 30.06.2020
После доработки 08.07.2020
Принята к публикации 30.07.2020

Tn антиген является опухолеспецифическим антигеном, который появляется на раковых клетках в результате аберрантного О-гликозилирования. Наиболее изученной формой Tn антигена является та, которая обнаруживается в составе муцинов, в частности муцина 1 (MUC1). Антитела против этой формы Tn антигена используются для диагностики опухолей, а также для создания Т-киллеров с химерным рецептором. Некоторые карциномы не несут MUC1, и для выявления Tn антигена на этих клетках требуются антитела иной специфичности. В нашей работе был выполнен поиск анти-Tn антител без предварительных предположений о том, на каких белках-носителях может проявляться Tn антиген. Для этого нами было получено несколько пар изогенных клеточных линий с диким типом и нокаутом гена *Cosmc*, который отвечает за корректность О-гликозилирования. С использованием созданных линий как иммуногенов нами было получено моноклональное антитело AKC3, которое реагировало с клетками аденокарциномы легкого A549, дефицитными по Cosmc, и не связывалось с клетками дикого типа. С помощью масс-спектрометрии, а также ко-иммунопреципитации было показано, что антитело AKC3 распознает Tn антиген в составе белка CD44, который имеет важное значение при опухолевом росте. Антитело AKC3 может найти применение в диагностике опухолей, а также использоваться при создании Т-клеток с химерным рецептором для лечения опухолей, которые не экспрессируют муцины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Tn антиген, О-гликозилирование, неоантигены, CD44, аденокарцинома легкого человека.

DOI: 10.31857/S0320972520090080

ВВЕДЕНИЕ

Важное значение в диагностике и иммунотерапии злокачественных новообразований имеют опухолеассоциированные и опухолеспецифические антигены. Поиск новых биомаркеров опухолевых клеток осуществляется как на протеомном, так и на иммунохимическом уровне. Если с помощью первого метода определяется структура неоантигенов, то с помощью второго – создаются реагенты для их детекции. Одним из путей формирования неоантигенов является аберрантное гликозилирование. При О-гликозилировании белков построение гликановой цепи начинается с присоединения к остаткам серина или треонина N-ацетилгалактозамина (GalNAc) [1]. При дефиците шаперона Cosmc дальнейшее наращивание гликановой цепи прекращается, и концевой GalNAc вместе с прилегающими аминокислотными остатками формирует так называемый Tn антиген [2]. Мутации в гене *Cosmc*, приводящие к образованию Tn антигена, наблюдаются в ряде опухолевых клеток. Более 70% карцином являются положительными по Tn антигену [3]. На нормальных клетках Tn антиген отсутствует.

Принятые сокращения: GalNAc – N-ацетилгалактозамин, LRG1 – богатый лейцином альфа-2-гликопротеин 1, leucine rich alpha-2-glycoprotein 1, MM – молекулярная масса, MUC1 – муцин 1, PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле, PBS – фосфатно-солевой раствор, SDS – додецилсульфат натрия, WB – Вестерн-блот.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-178, 03.09.2020.

** Адресат для корреспонденции.

К настоящему времени получено значительное число антител против Tn антигена [4, 5], которые можно разделить на две большие группы: на антитела, зависимые и независимые от пептидного окружения GalNAc. Пептид-независимые антитела имеют широкий спектр реактивности и связываются с Tn антигеном в составе самых разнообразных белков [6]. К сожалению, такие антитела принадлежат к классу IgM и обладают невысокой константой связывания. Пептид-зависимые антитела представляют больший интерес, поскольку характеризуются высоким аффинитетом, однако они имеет узкий спектр реактивности и реагируют с Tn антигеном в составе только определенных белков. Как правило, анти-Tn антитела получали иммунизацией гликопептидами из муцина, который является наиболее известным белком-носителем Tn антигена. Данные о биомаркерах аберрантного гликозилирования, представленные на других белках, очень ограничены.

Ранее для поиска пептид-специфичных анти-Tn антител на неизвестных белках-носителях нами был предложен метод, использующий Cosmc изогенные линии клеток [7]. Для иммунизации и скрининга нами была использована пара клеточных линий: Jurkat wt, которая конститутивно является дефектной по гену *Cosmc*, а также клетки Jurkat, трансдуцированные геном *Cosmc* дикого типа. Это позволило нам получить антитела против Tn антигена в составе белков CD45 и CD43, которые до этого не были известны, как возможные носители Tn антигена [8].

Целью настоящего исследования является поиск новых биомаркеров карцином, которые образуются в результате аберрантного гликозилирования и впоследствии могут использоваться в диагностике и терапии опухолей. Для достижения этой цели нами были поставлены следующие задачи: (1) путем нокаутирования гена *Cosmc* получить изогенные линии клеток, несущие, в отличие от клеток «дикого типа», Tn антиген; (2) получить пептид-специфичные моноклональные антитела против Tn антигена, представленного на клетках карциномы легкого; (3) идентифицировать новые биомаркеры опухолевых клеток с аберрантным гликозилированием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток, антитела и проточная цитометрия. Клетки линий A549, MCF-7 и RPMI 8226 («ATCC», США) культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, 4 мМ L-глутамина и гентамицина (80 мг/л) («ПанЭко», Россия) при 37 °C, в увлажненной атмосфере 5% CO_2. Антитела He7 (IgG2a, анти-CD44), ER1 (IgG2b, анти-CD99), JA1 (IgM, анти-Tn антиген) были получены ранее в нашей лаборатории [7]. Для получения новых моноклональных антител мышей BALB/c трехкратно иммунизировали клетками-мишенями, после чего клетки селезенки иммунных мышей гибридизовали с миеломой Sp2/0. Культуральные супернатанты гибридных клеток через 10 дней тестировали в иммунофлуоресцентном тесте на клетках-мишенях и отбирали позитивные клоны [7].

Для иммунофлуоресцентного окрашивания к осадку 1×10^6 клеток добавляли 50 мкл первичных немеченых антител и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Затем клетки дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Далее клетки инкубировали с FITC-мечеными вторичными антителами против мышиного IgG или IgM («Merck», США) и отмывали. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S («Beckman-Coulter», США). В качестве негативного контроля использовали клетки, обработанные только вторичными антителами.

Создание клеточных линий с нокаутом гена *Cosmc*. Выбор таргетной последовательности в гене *Cosmc* (Gene ID: 29071) проводили с помощью онлайн ресурса, описанного в работе Hsu et al. [9]. Последовательность gRNA была закодирована в пару комплементарных ДНК олигонуклеотидов для последующего клонирования в вектор: 5-gR-Cosmc: 5′-CACCGCAATGATAGCAAACGTAGTG-3′ и 3-gR-Cosmc: 5′-AAACCACTACGTTTGCTATCATTGC-3′. Наряду с этим была использована gRNA из работы Stolfa et al. [10].

Олигонуклеотиды отжигали и клонировали в вектор pKS-gRNA-BB по рестрикционному сайту BbsI [11]. 1 млн клеток трансфицировали с помощью системы для электропорации Neon («Thermo Fisher», США). Через 5 суток после трансфекции с помощью антитела JA1 на клетках оценивали экспрессию Tn антигена, клетки наращивали и сортировали позитивную по Tn антигену популяцию с помощью прибора FACSAria II («Becton Dickinson Biosciences», США).

Периодатное окисление. Клетки A549 в течение 10 мин фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида и 1 ч обрабатывали 20 мМ раствором периодата натрия в PBS. Клетки 2 раза отмывали в PBS, и образовавшиеся альдегидные группы блокировали в течение 30 мин в

полной среде DMEM, содержавшей 10% эмбриональной телячьей сыворотки [8].

Анализ углеводной специфичности антител с помощью гликочипов. Гликочипы были получены печатью гликанов на стеклянные слайды («Schott-Nexterion», Германия), активированные с помощью гидроксисукцинимида. На каждом слайде было иммобилизовано ~400 различных лигандов, которые представляли собой синтетические компоненты гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих, а также 200 бактериальных полисахаридов. Полный список лигандов приведен в работе Dobrochaeva et al. [12]. Гликочип инкубировали с раствором антитела, отмывали в растворе PBS, содержавшем 0,1% (*v/v*) Tween-20, окрашивали вторичными антителами против IgG мыши, меченными Alexa555 и еще раз отмывали. Флуоресценцию регистрировали на сканере Innoscan 710 Fluorescence Scanner («Innopsys», France).

Флуоресцентный иммунопреципитационный анализ. 2×10^7 клеток окрашивали с помощью аминореактивного флуоресцентного красителя Cy3 (10 мг/мл) («Lumiprobe», Россия) [13]. Клетки 30 мин лизировали при 4 °C в 1 мл лизирующего буфера 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, содержавшем 1% (*w/v*) Triton X-100, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида («Merck», США). Иммунопреципитацию проводили путем добавления 1 мл лизата к 20 мкл А-Белок-агарозы («Thermo Fisher», США) с преформированным на ней комплексом преципитирующих антител и последующей инкубации в течение 2 ч при 4 °C. Иммунопреципитаты отмывали трижды, каждый раз добавляя по 800 мкл лизирующего буфера. Связавшиеся флуоресцентно-меченые белки элюировали с носителя прогреванием иммунопреципитатов с буфером образца для электрофореза в течение 5 мин при 95 °C.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг (WB). Элюированные белки разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях в буферной системе Лэммли [7]. Визуализацию белков в геле проводили на флуоресцентном сканере Molecular Imager FX Pro («Bio-Rad», США), регистрируя флуоресценцию при 600 нм.

Разделенные белки полусухим методом переносили из геля на PVDF-мембрану («Merck», США) [7] и проявляли с помощью первичных, а затем вторичных антител против мышиного IgG, меченных пероксидазой хрена («GE Healthcare», США). Визуализацию блотов проводили на приборе ChemiDoc XRS («Bio-Rad», США) с использованием реагентов для хемилюминесценции («Merck», США).

Масс-спектрометрический анализ. Белковые полоски (~5 мм^3) вырезали из геля, отмывали 3 раза в деионизованной воде и проводили трипсинолиз, как описано ранее [13]. Смесь пептидов в объеме 1,5–2,0 мкл загружали на колонку Ultimeta 3000 Plus RSLC nano («Thermo Fisher», США) и разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии с использованием линейного градиента 2→37% подвижной фазы (ацетонитрил с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 0,03% уксусной кислоты). Регистрацию сигнала проводили с использованием масс-спектрометра Q-Exactive HF-X («Thermo Fisher», США) в диапазоне 425–1300 m/z. Идентификацию белков по тандемным масс-спектрам триптических пептидов проводили с помощью программы SearchGUI и Peptideakher [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание клеточных линий, дефицитных по гену *Cosmc*. Для получения клеточных линий MCF-7, A549 и RPMI 8226 с аберрантным О-гликозилированием была использована технология нокаутирования генов с помощью CRISPR/Cas9 [9]. Клетки трансфецировали компонентами системы CRISPR/Cas9 и через 5 дней выявляли 5–10% Tn положительных клеток, которые определяли с помощью пептид-независимого анти-Tn антитела JA1. После двух раундов сортировки были получены клеточные линии, в которых Tn-позитивными были не менее 90% клеток.

Получение моноклонального антитела против аберрантно гликозилированных клеток A549. Для генерации новых моноклональных антител против Tn-антигена мышь BALB/c была проиммунизирована клетками A549, нокаутными по гену *Cosmc* (A549-Cosmc-KO). Клетки селезенки мыши были гибридизованы с миеломой Sp2/0. На первом этапе скрининга отбирали гибридомы, секретирующие антитела, которые реагировали с клетками A549-Cosmc-KO. На следующем этапе скрининга исключали клоны, реагировавшие с клетками A549 дикого типа. В результате отбора был получен клон AKC3, секретирующий антитело IgG1 изотипа. Это антитело ярко окрашивало клетки A549, нокаутные по гену *Cosmc*, и минимально связывалось с клетками A549 дикого типа (рис. 1, *a*). При этом антитело AKC3 не реагировало с Tn-позитивными клетками MCF-7 и RPMI 8226, дефицитными по гену *Cosmc* (рис. 1, *a*).

Биохимическая характеристика антигена AKC3. Для того чтобы проверить, что связывание антитела AKC3 зависит от присутствия угле-

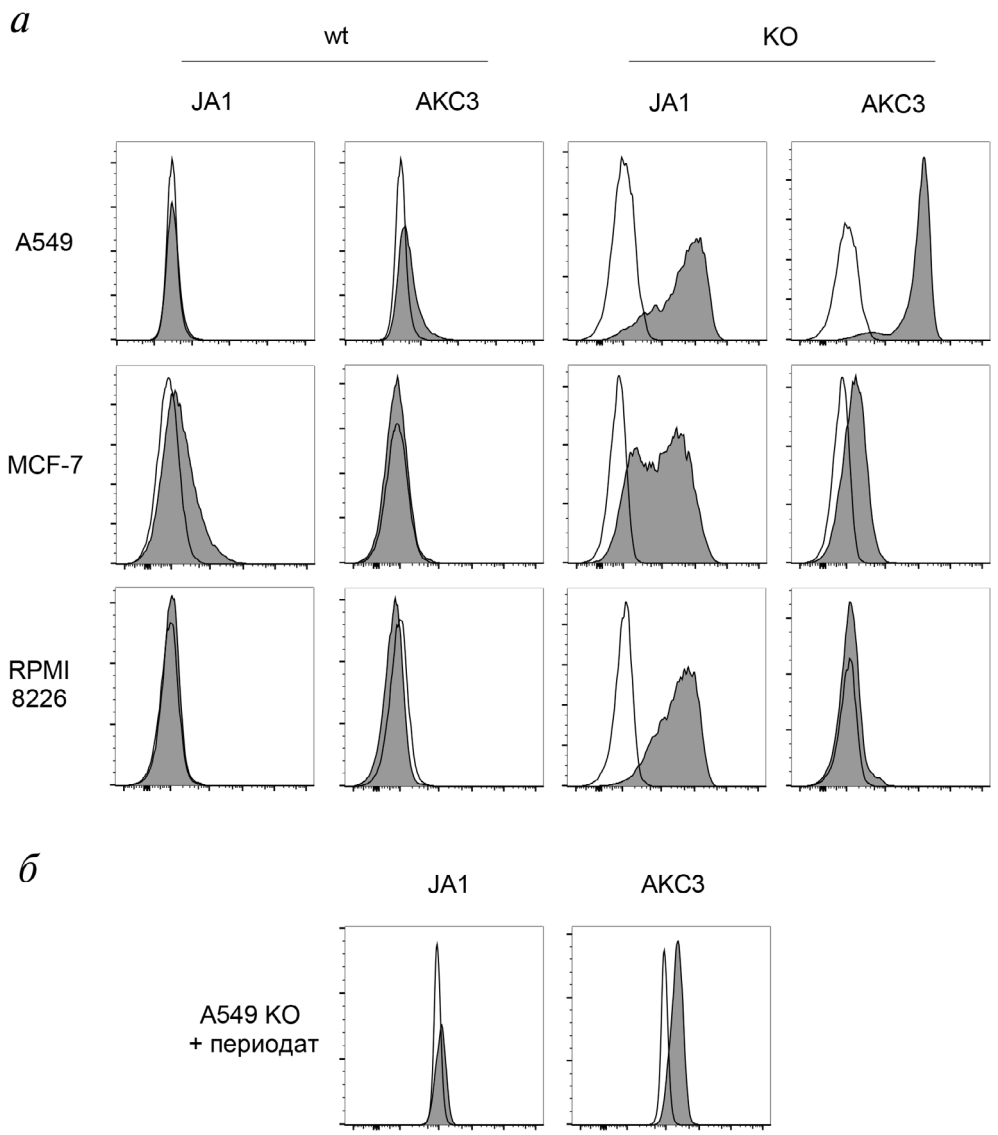


Рис. 1. Экспрессия Tn антигена на клетках, нокаутированных по гену *Cosmc*. *а* – Клетки A549 (верхний ряд), MCF-7 (средний ряд) или RPMI 8226 (нижний ряд) окрашивали антителом JA1 или AKC3, затем вторичными антителами против Ig мыши, меченными FITC, и анализировали на проточном цитометре (закрашенные гистограммы). Отрицательный контроль (клетки окрашивали только вторичными антителами) представлен не закрашенными гистограммами. В двух левых колонках представлены клетки дикого типа (wt), в двух правых колонках – клетки, нокаутированные по гену *Cosmc* (KO); *б* – клетки A549, нокаутированные по гену *Cosmc* (KO), перед окрашиванием антителами JA1 или AKC3 обрабатывали 20 мМ раствором периодата натрия

водной детерминанты, было проведено мягкое периодатное окисление клеток. Клетки A549-Cosmc-KO, обработанные периодатом натрия, теряли способность окрашиваться антителом AKC3 (рис. 1, *б*). Тестирование антитела AKC3 на гликочипе, имеющем в своем составе более 400 различных гликанов, включая GalNAcα, GalNAcα-Ser и несколько десятков олигосахаридов с терминальным или внутренним фрагментом GalNAcα [13], дало отрицательные результаты. Таким образом, связывание AKC3 является зависимым от присутствия углеводной цепи, но полностью ею не определяется и зависит от конкретных белков-носителей, которые экспрессированы клетками A549.

Для того чтобы охарактеризовать белки-носители антигена AKC3, мы использовали метод флуоресцентной иммунопреципитации (FIPA) [13]. Антиген AKC3, выделенный на иммуносорбенте на основе антитела AKC3, мигрировал в SDS-PAGE геле в виде двух полос (рис. 2, *а*). Мажорная верхняя полоса соответствовала белку с молекулярной массой (ММ) ~85 кДа. Нижняя полоса была менее интенсивная и зачастую

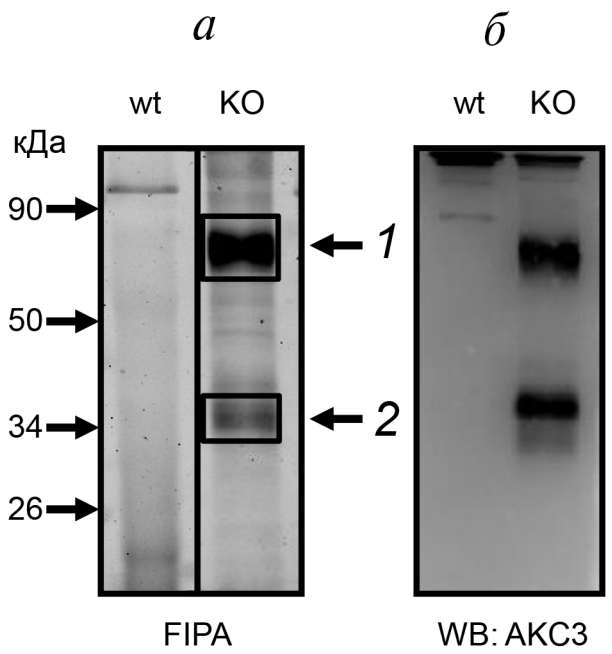


Рис. 2. Иммунопреципитация антигена, выявляемого антителом AKC3. *а* – Клетки метили красителем Cy3, лизировали в 1%-ном (*w/v*) Triton X-100 и иммунопреципитировали на антителе AKC3. Выделенные белки разделяли в 12%-ном SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и регистрировали флуоресценцию геля (FIPA). Белковые полосы *1* и *2* вырезали и подвергали масс-спектрометрическому анализу; *б* – белки из геля переносили на PVDF-мембрану и проявляли с помощью Вестерн-блоттинга антителом AKC3. В качестве клеток-мишеней использовали клетки A549 дикого типа (wt) или клетки A549, нокаутированные по гену *Cosmc* (KO)

проявлялась в виде двух близко расположенных полос в области 35 кДа. Те же полосы наблюдались в Вестерн-блоттинге (рис. 2, *б*). Положение всех полос не менялось при переходе с восстанавливающих на невосстанавливающие условия электрофореза. Таким образом, антиген AKC3 присутствует, по крайней мере на двух белках-носителях, которые являются одноцепьевыми молекулами.

Масс-спектрометрический анализ антигена AKC3. Для того чтобы идентифицировать белки, несущие Tn антиген, две полосы, полученные при иммунопреципитации с помощью антитела AKC3 (рис. 2, *а*), были вырезаны из геля и обработаны трипсином. Полученные пептиды были проанализированы методом тандемной масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией с предварительным разделением пептидов методом жидкостной хроматографии. Наиболее релевантные идентифицированные белки представлены в таблице. Для полосы *1* наибольший интерес представлял белок CD44, для которого было проведено более детальное исследование.

Ко-иммунопреципитационный анализ антигена AKC3. Обращает на себя внимание то, что полоса преципитации CD44, полученного из лизата клеток A549-Cosmc-KO, довольно точно совпадает с верхней полосой антигена AKC3 (рис. 3, дорожки *3* и *4*). Можно отметить также то, что CD44, выделенный из клеток дикого типа, имел несколько меньшую подвижность, чем CD44 из клеток A549-Cosmc-KO (рис. 3, дорожка *2*). Это наблюдение соответствует тому, что в клетках дикого типа степень гликозилирования CD44 должна быть выше, чем в нокаутных клетках.

Для проверки предположения о том, что CD44 является белком-носителем Tn антигена, были проведены эксперименты по взаимной ко-иммунопреципитации CD44 и антигена AKC3. С этой целью сначала с помощью иммуноаффинных сорбентов на основе А-Белок-агарозы были выделены CD44 и антиген AKC3 (рис. 4, *а*). Затем полученные белки были окрашены методом WB с помощью антитела против CD44 (рис. 4, *б*) и антигена AKC3 (рис. 4, *в*). Эти эксперименты показали, что полоса CD44 и верхняя полоса антигена AKC3 одинаково эффективно проявлялись как антителом против CD44, так и антителом AKC3 (рис. 4, *б* и *в*). В противоположность этому нижняя полоса антигена AKC3 в WB проявлялась только антителом AKC3, но не антителом против антигена CD44. В качестве отрицательного контроля в этих экспериментах использовали иммунопреципитацию на антителе против CD9. Полосы, обозначенные на WB символами H и L, проявлялись как в опытных, так и в контрольных дорожках. Эти полосы появлялись в результате диссоциации легких и тяжелых цепей антител, которые использовались для иммунопреципитации. За исключением цепей H и L, других полос в дорожке с отрицательным контролем не выявлялось.

Молекулярная масса нижней полосы антигена AKC3 довольно близка к таковой белка

Масс-спектрометрическая идентификация белков, выделенных иммунопреципитацией с помощью антитела AKC3

Полоса (рис. 2, *а*)	Белок	Ген	ММ, кДа
1	POTE ankyrin domain family member F	*POTEF*	121,4
1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	*ITIH1*	101,3
1	CD44 antigen	*CD44*	81,5
2	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	*LRG1*	38,1

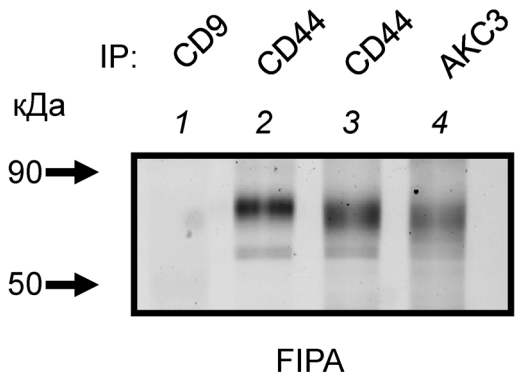


Рис. 3. Сравнение электрофоретической подвижности белка CD44, выделенного из клеток A549 дикого типа и клеток A549, нокаутированных по гену *Cosmc*. Иммунопреципитацию проводили с антителами против CD44, AKC3 или CD9 (отрицательный контроль). В качестве клеток-мишеней использовали клетки A549 дикого типа (дорожка *2*) или клетки A549, нокаутированные по гену *Cosmc* (дорожки *1*, *3* и *4*).

CD99. Известно, что CD99 имеет по меньшей мере один сайт O-гликозилирования, т.е. теоретически может нести Tn-антиген. Для того чтобы проверить возможную связь между CD99 и AKC3 для пары антител CD99 и AKC3, были выполнены эксперименты по ко-иммунопреципитации, аналогично тому, как это было сделано для пары антител CD44 и AKC3 (рис. 5). Однако никакой ко-иммунопреципитации между CD99 и AKC3 обнаружено не было. Кроме того, прямое сравнение электрофоретической подвижности CD99 и антигена AKC3 показало, что последний обладает заметно более высокой ММ. Очевидно, что нижняя полоса антигена AKC3 никак не связана с белком CD99.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Путем нокаутирования гена *Cosmc* нами были получены 3 пары изогенных линий клеток, которые отличались по экспрессии Tn антигена. Используя изогенные клетки A549, мы получили моноклональное антитело AKC3, которое реагировало с A549-Cosmc-KO клетками и не связывалось с линией A549 wt. При окислении углеводных остатков с помощью периодата натрия связывание антитела AKC3 с клетками отменялось. Таким образом, по своей специфичности AKC3 является анти-Tn антителом. Особенностью нашей работы являлось то, что AKC3 было получено без какого-либо предварительного предположения о белках, в составе которых может присутствовать Tn антиген.

С помощью метода флуоресцентной иммунопреципитации, а также WB мы обнаружили, что AKC3 реагирует с двумя белками с ММ 85 и 34 кДа. Масс-спектрометрический анализ показал, что в полосе 85 кДа обнаруживаются пептиды из белка CD44. Принадлежность антигена AKC3 к белку CD44 была подтверждена при прямом сравнении электрофоретической подвижности этих молекул, а также в эксперимен-

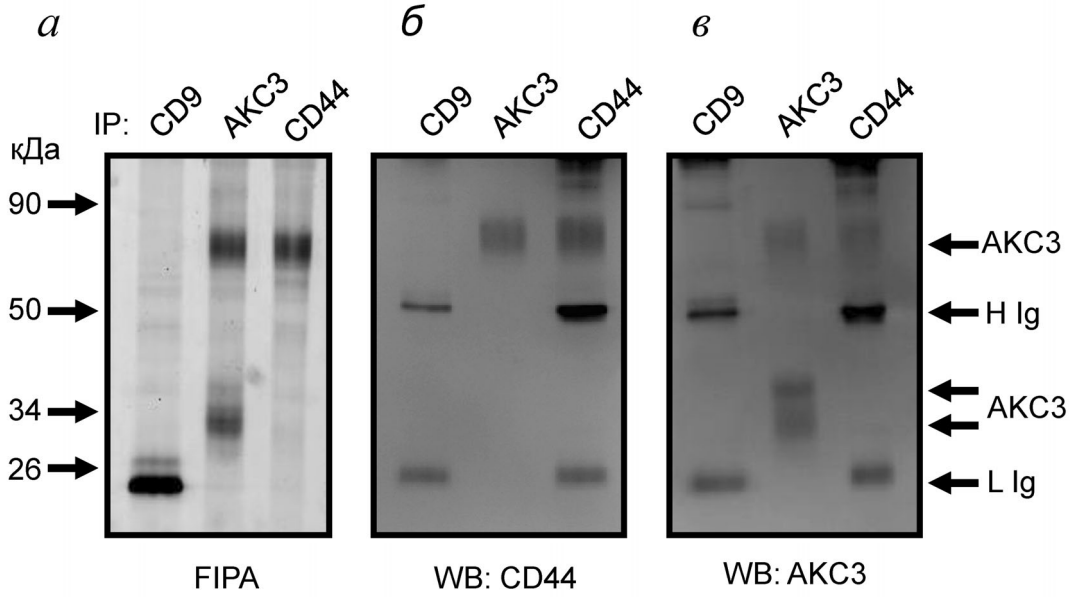


Рис. 4. Ко-иммунопреципитация белка CD44 и антигена AKC3 из лизата клеток A549, нокаутированных по гену *Cosmc*. Иммунопреципитацию проводили на антителах против CD9, CD44 или AKC3. Выделенные белки разделяли в 12%-ном SDS-PAGE и регистрировали флуоресценцию геля (*а*), далее белки переносили на PVDF-мембрану и проявляли с помощью WB антителами против CD44 (*б*) или AKC3 (*в*)

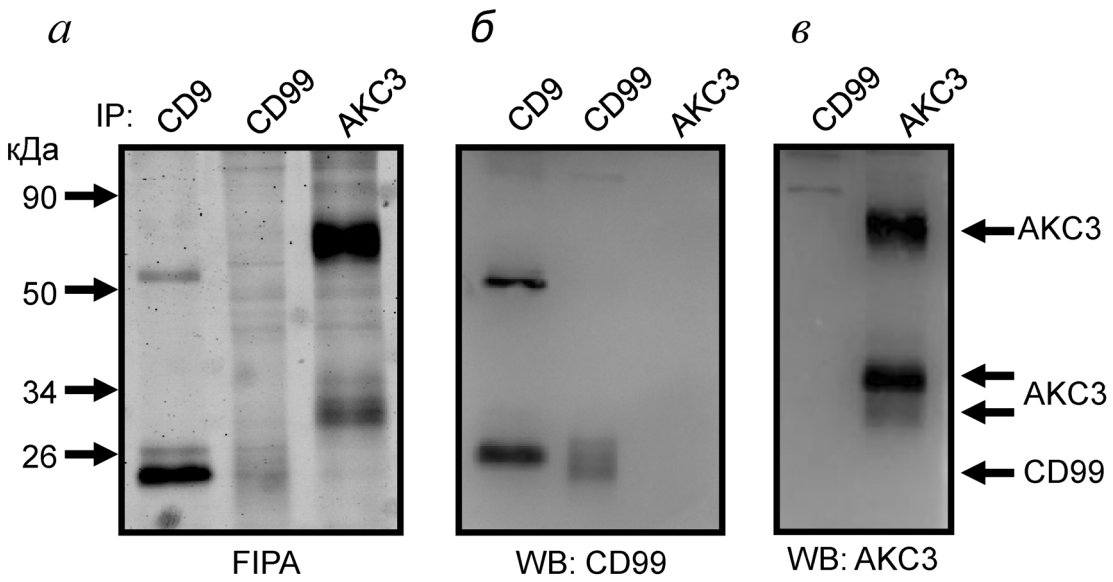


Рис. 5. Ко-иммунопреципитация белка CD99 и антигена AKC3 из лизата клеток A549, нокаутированных по гену *Cosmc*. Иммунопреципитацию проводили на антителах против CD9, CD99 или AKC3. *а* – Выделенные белки разделяли в 12%-ном SDS-PAGE и регистрировали флуоресценцию геля, далее белки переносили на PVDF-мембрану и проявляли с помощью Вестерн-блоттинга антителами против CD99 (*б*) или AKC3 (*в*)

тах по ко-иммунопреципитации. С этим согласуется также отсутствие реактивности антитела AKC3 с сублиниями MCF-7 и RPMI 8226, дефицитными по гену *Cosmc*, которые несут Tn антиген, однако не экспрессируют белок CD44.

Стандартная форма человеческого CD44 (CD44s) состоит из 361 аминокислотного остатка и имеет расчетную ММ 39,4 кДа. CD44 является высоко-гликозилированным белком, вследствие чего при электрофорезе он мигрирует в области 85–90 кДа. CD44s имеет 6 потенциальных сайтов N-гликозилирования и 32 сайта O-гликозилирования [14]. Наиболее вероятным является O-гликозилирование 4-х сайтов, расположенных в мотивах Ser-Gly, которые находятся во внеклеточной части CD44s, которая непосредственно прилегает к трансмембранному домену [15]. По другой оценке, CD44s O-гликозилирован по 7 сайтам [16]. Обращает на себя внимание, что CD44, выделенный из нокаутных клеток, имел большую электрофоретическую подвижность, чем CD44 из клеток дикого типа. Это хорошо согласуется с тем, что в нокаутных клетках O-гликозилирование должно быть неполным. Таким образом, по своим характеристикам CD44s удовлетворяет предполагаемым свойствам антигена, распознаваемого AKC3.

CD44 имеет важное функциональное значение. CD44 является рецептором гиалуроновой кислоты, он также связывается с другими компонентами межклеточного матрикса. Как следствие, CD44 участвует в процессах клеточной адгезии, миграции, а также дифференцировке клеток. Велика роль CD44 в опухолевом росте и метастазировании [17]. На опухолевый рост влияет как общая экспрессия белка CD44 [18], так и присутствие его отдельных гликоформ. В частности, изменения в степени гликозилирования CD44 могут регулировать опухолевый рост [19]. Гликозилирование влияет на связывание с гиалуроновой кислотой и тем самым изменяет адгезионные свойства молекулы CD44 [15]. Было показано, что клетки из первичной меланомы, а также метастазов различаются по степени O-гликозилирования молекулы CD44 [15].

Данные масс-спектрометрии позволяют предположить, что белком-носителем Tn антигена из нижней полосы (рис. 2) может являться богатый лейцином гликопротеин 1 (Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1, LRG1). LRG1 имеет ММ 38 кДа, что довольно близко к массе нижней полосы. Он обладает сайтом O-гликозилирования. По этим критериям LRG1 подходит на роль искомого белка, однако LRG1 экспрессируется преимущественно в нейтрофилах, не имеет мембранной локализации и секретируется в плазму [20]. Таким образом, маловероятно, что антиген AKC3 связан с белком LRG1. Проблематичной выглядит также возможность для антитела AKC3 реагировать с двумя различными белками, хотя этого нельзя исключить полностью. Например, анти-Tn антитело JA5 одновременно реагировало с белками CD45 и CD43 [7]. Высоко O-гликозилированный поверхност-

ный гликопротеин CD99 имеет ММ 32 кДа, что примерно соответствует массе антигена AKC3 из нижней полосы (рис. 2). Однако прямое сравнение электрофоретической подвижности CD99 и нижней полосы антигена AKC3 показало, что они являются разными белками. Эксперименты по ко-иммунопреципитации также исключают связь этих белков.

Следует отметить, что в дополнение к стандартной молекуле CD44s существует изоформа CD44 с укороченным цитоплазматическим концом (CD44 short-tail; CD44st). Исходя из аминокислотной последовательности, CD44st имеет расчетную ММ 32 кДа [14]. При минимальном гликозилировании ММ CD44st соответствует нижней полосе антигена AKC3. Экспрессия изоформы CD44st наблюдалась в клетках Lovo, K562 и HL-60 [21].

Ранее для поиска опухолеассоциированных белков с аберрантным гликозилированием был предложен подход, который получил название SimpleCells [22]. Пользуясь этой стратегией, было получено антитело против опухолевого биомаркера, который представлял собой Tn антиген в составе белка дисадгерина [23]. При нокаутировании гена *Cosmc* в результате широко масштабного протеомного исследования на клетках рака желудка было идентифицировано 499 O-гликозилированных белков, которые несли более 1000 различных гликосайтов. Интересно, что среди белков с аберрантным гликозилированием был также обнаружен белок CD44 [22].

Поскольку Tn антиген является опухолеассоциированным антигеном, он давно рассматривался как привлекательная мишень при лечении карцином. Антитела против Tn антигена могут использоваться в качестве пассивной вакцины при иммунотерапии рака [24]. На основе антител против Tn антигена идет разработка Т-киллеров с химерным рецептором [25, 26]. Большая часть известных анти-Tn антител распознает этот антиген в составе муцинов. Нами было получено новое анти-Tn антитело, которое реагирует с Tn антигеном в контексте белка CD44. После секвенирования генов Ig гибридомы AKC3 будет получена хорошая основа для создания Т-клеток с CAR-рецептором для лечения $CD44^+$ опухолей, которые не экспрессируют муцины.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-07025 мк).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов. Протокол экспериментов с лабораторными мышами был одобрен Комитетом по этическому отношению к животным при Институте иммунологии. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ju, T., Otto, V. I., and Cummings, R. D. (2011) The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1770-1791, doi: 10.1002/anie.201002313.
2. Ju, T., Lanneau, G. S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S. R., Willard, M. T., Wang, W., Xia, J. Y., Zuna, R. E., Laszik, Z., Benbrook, D. M., Hanigan, M. H., and Cummings, R. D. (2008) Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in *Cosmc*, *Cancer Res.*, **68**, 1636-1646, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2345.
3. Springer, G. F. (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy, *J. Mol. Med.*, **75**, 594-602, doi: 10.1007/s001090050144.
4. Schietinger, A., Philip, M., Yoshida, B. A., Azadi, P., Liu, H., Meredith, S. C., and Schreiber, H. (2006) A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen, *Science*, **314**, 304-308, doi: 10.1126/science.1129200.
5. Tarp, M. A., and Clausen, H. (2008) Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 546-563, doi: 10.1016/j.bbagen.2007.09.010.
6. Persson, N., Stuhr-Hansen, N., Risinger, C., Mereiter, S., Polónia, A., Polom, K., Kovács, A., Roviello, F., Reis, C. A., Welinder, C., Danielsson, L., Jansson, B., and Blixt, O. (2017) Epitope mapping of a new anti-Tn antibody detecting gastric cancer cells, *Glycobiology*, **27**, 635-645, doi: 10.1093/glycob/cwx033.
7. Blixt, O., Lavrova, O. I., Mazurov, D. V., Clo, E., Kracun, S. K., Bovin, N. V., and Filatov, A. V. (2012) Analysis of Tn antigenicity with a panel of new IgM and IgG1 monoclonal antibodies raised against leukemic cells, *Glycobiology*, **22**, 529-542, doi: 10.1093/glycob/cwr178.
8. Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., and Filatov, A. (2012) Role of O-glycosylation and expression of CD43 and CD45 on the surfaces of effector T cells in human T cell leukemia virus type 1 cell-to-cell infection, *J. Virol.*, **86**, 2447-2458, doi: 10.1128/JVI.06993-11.
9. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., and Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 827-832, doi: 10.1038/nbt.2647.
10. Stolfa, G., Mondal, N., Zhu, Y., Yu, X., Buffone, A., and Neelamegham, S. (2016) Using CRISPR-Cas9 to quantify the contributions of O-glycans, N-glycans and Glycosphingolipids to human leukocyte-endothelium adhesion, *Sci. Rep.*, **6**, 30392, doi: 10.1038/srep30392.
11. Tarasevich, A., Filatov, A., Pichugin, A., and Mazurov, D. (2015) Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells, *Acta Virol.*, **59**, 247-256, doi: 10.4149/av_2015_03_247.

12. Dobrochaeva, K., Khasbiullina, N., Shilova, N., Antipova, N., Obukhova, P., Ovchinnikova, T., Galanina, O., Blixt, O., Kunz, H., Filatov, A., Knirel, Y., LePendu, J., Khaidukov, S., and Bovin, N. (2020) Specificity of human natural antibodies referred to as anti-Tn, *Mol. Immunol.*, **120**, 74-82, doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.005.
13. Filatov, A. V., Krotov, G. I., Zgoda, V. G., and Volkov, Y. (2007) Fluorescent immunoprecipitation analysis of cell surface proteins: a methodology compatible with mass-spectrometry, *J. Immunol. Methods*, **319**, 21-33, doi: 10.1016/j.jim.2006.09.014.
14. Azevedo, R., Gaiteiro, C., Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Lima, L., Santos, L. L., and Ferreira, J. A. (2018) CD44 glycoprotein in cancer: a molecular conundrum hampering clinical applications, *Clin. Proteom.*, **15**, 22, doi: 10.1186/s12014-018-9198-9.
15. Gasbarri, A., Del Prete, F., Girnita, L., Martegani, M. P., Natali, P. G., and Bartolazzi, A. (2003) CD44s adhesive function spontaneous and PMA-inducible CD44 cleavage are regulated at post-translational level in cells of melanocytic lineage, *Melanoma Res.*, **13**, 325-337, doi: 10.1097/00008390-200308000-00001.
16. Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 33-45, doi: 10.1038/nrm1004.
17. Naor, D., Sionov, R. V., and Ish-Shalom, D. (1997) CD44: structure, function and association with the malignant process, *Adv. Cancer Res.*, **71**, 241-319, doi: 10.1016/S0065-230X(08)60101-3.
18. Hu, B., Ma, Y., Yang, Y., Zhang, L., Han, H., and Chen, J. (2018) CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer, *Oncol. Lett.*, **15**, 5627-5633, doi: 10.3892/ol.2018.8051.
19. Du, T., Jia, X., Dong X., Ru, X., Li, L., Wang, Y., Liu, J., Feng, G., and Wen, T. (2020) Cosmc disruption-mediated aberrant O-glycosylation suppresses breast cancer cell growth via impairment of CD44, *Cancer Manag. Res.*, **12**, 511-522, doi: 10.2147/CMAR.S234735.
20. O'Donnell, L. C., Druhan, L. J., and Avalos, B. R. (2002) Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation, *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 478-485.
21. Fang, X. J., Jiang, H., Zhu, Y. Q., Zhang, L. Y., Fan, Q. H., and Tian, Y. (2014) Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF-κB in human breast cancer MCF-7 cells, *Oncol. Rep.*, **31**, 2735-2742, doi: 10.3892/or.2014.3131.
22. Campos, D., Freitas, D., Gomes, J., Magalhães, A., Steentoft, C., Gomes, C., Vester-Christensen, M. B., Ferreira, J. A., Afonso, L. P., Santos, L. L., Pinto de Sousa, J., Mandel, U., Clausen, H., Vakhrushev, S. Y., and Reis, C. A. (2015) Probing the O-glycoproteome of gastric cancer cell lines for biomarker discovery, *Mol. Cell. Proteomics*, **14**, 1616-1629, doi: 10.1074/mcp.M114.046862.
23. Steentoft, C., Fuhrmann, M., Battisti, F., Van Coillie, J., Madsen, T. D., Campos, D., Adnan Halim, A., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Schreiber, H., Mandel, U., and Narimatsu, Y. (2019) A strategy for generating cancer-specific monoclonal antibodies to aberrant O-glycoproteins: identification of a novel dysadherin-Tn antibody, *Glycobiology*, **29**, 307-319, doi: 10.1093/glycob/cwz004.
24. Welinder, C., Baldetorp, B., Borrebaeck, C., Fredlund, B.-M., and Jansson, B. (2011) A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with *in vivo* anti-tumor activity, *Glycobiology*, **21**, 1097-1107, doi: 10.1093/glycob/cwr048.
25. Posey, A. D., Schwab, R. D., Boesteanu, A. C., Steentoft, C., Mandel, U., Engels, B., Stone, J. D., Madsen, T. D., Schreiber, K., Haines, K. M., Cogdill, A. P., Chen, T. J., Song, D., Scholler, J., Kranz, D. M., Feldman, M. D., Young, R., Keith, B., Schreiber, H., Clausen, H., Johnson, L. A., and June, C. H. (2016) Engineered CAR T cells targeting the cancer-associated Tn-glycoform of the membrane mucin MUC1 control adenocarcinoma, *Immunity*, **44**, 1444-1454, doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.014.
26. Gorchakov, A. A., Kulemzin, S. V., Kochneva, G. V., and Taranin, A. V. (2020) Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T-cell therapy for metastatic prostate cancer, *Eur. Urol.*, **77**, 299-308, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.014.

CD44-ASSOCIATED Tn ANTIGEN AS A NEW BIOMARKER OF TUMOR CELLS WITH ABERRENT GLYCOSYLATION*

M. L. Shuvalova[1], A. T. Kopylov[2], D. V. Mazurov[1], A. V. Pichugin[1], N. V. Bovin[3], and A. V. Filatov[1,4]**

[1] *Institute of Immunology National Research Center, Federal Medical-Biological Agency, 115522 Moscow, Russia; E-mail: avfilat@yandex.ru*

[2] *Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia*

[3] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

[4] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Immunology Department, 119234 Moscow, Russia*

Received June 30, 2020
Revised July 8, 2020
Accepted July 30, 2020

Tn antigen is a tumor-associated antigen that appears on cancer cells as a result of aberrant O-glycosylation. The most studied form of Tn antigen is found in mucins, in particular, in mucin 1 (MUC1). Antibodies against this form of Tn antigen are used to diagnose tumors, as well as to generate T-killers with a chimeric receptor. Some carcinomas do not carry MUC1 and antibodies of a different specificity are required to detect Tn antigen on these cells. In our work, we searched for anti-Tn antibodies without preliminary assumptions about the proteins that may be carriers of the Tn antigen. For this purpose, we obtained several pairs of isogenic cell lines with the wild type and knockout of the *Cosmc* gene, which is essential for correct protein O-glycosylation. Using the created lines as immunogens, we generated a monoclonal antibody AKC3, which reacted with the Cosmc-deficient A549 lung adenocarcinoma cells and did not bind to the wild-type cells. Using mass spectrometry, as well as co-immunoprecipitation, it was shown that the AKC3 antibody recognized the Tn antigen in the context of CD44 protein – a protein important for tumor growth. The AKC3 antibody can be used for tumor diagnosis, and to generate T cells with a chimeric receptor for treatment of tumors that do not express mucins.

Keywords: Tn antigen, O-glycosylation, neoantigens, CD44, human lung adenocarcinoma

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1294 – 1304

УДК 577.24

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ СОДЕРЖАНИИ ЖИВОТНЫХ НА СТАНДАРТНОЙ СУХОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИЕТЕ*

© 2020 В.Б. Вайс[1], И.М. Вангели[1], О.А. Аверина[1], М.Л. Ловать[2], Л.Е. Бакеева[1]**

[1] *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bakeeva@belozersky.msu.ru*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 07.07.2020
После доработки 07.07.2020
Принята к публикации 18.07.2020

Исследование ультраструктуры гепатоцитов печени, проведенное методом трансмиссионной электронной микроскопии, показало, что у лабораторных мышей, содержавшихся в различных вивариях в г. Москва и получавших питание в виде сухой лабораторной диеты отечественных производителей, не имеющей стандартизации по исходным продуктам, развиваются значительные деструктивные изменения гепатоцитов. При этом нарушения в ультраструктуре паренхимных клеток печени происходят вне зависимости от статуса животного (SPF или конвенциональные), условий различных вивариев, а также производителя корма. В то же время ультраструктурное исследование гепатоцитов печени мышей, содержавшихся в питомнике «Charles River» (Германия) и получавших корм фирмы «Altromin Spezialfutter» («GmbH&Co», Германия), использующих входной контроль качества ингредиентов, не выявило деструктивных нарушений во внутренней ультраструктуре гепатоцитов. Однако если эти мыши в дальнейшем получали корм, произведенный в России, нарушения структуры клеток печени развивались уже через 2 месяца. Таким образом, питание сухими кормами отечественных производителей неуказанного состава вызывает у контрольных животных значительные изменения в ультраструктуре гепатоцитов, отражающие развитие патологических процессов в организме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, гепатоциты, ультраструктура, мыши, стандартная лабораторная диета.

DOI: 10.31857/S0320972520090092

ВВЕДЕНИЕ

Печень – самая крупная железа пищеварительной системы, выполняющая множество важнейших функций. Ткани печени стали одними из первых для широкого изучения методом электронной микроскопии. Благодаря быстрому прогрессу этого метода был накоплен огромный материал, касающийся ультратонкого строения ткани печени. Ультраструктура гепатоцитов была подробно изучена в ряде классических работ 50–60 гг. XX века. Впервые ультраструктура клеток печени была описана Dalton et al. [1] и Fawcett et al. [2], однако классической считается работа Bruni и Porter [3], в которой, используя различные методы фиксации ткани печени, авторами были показаны особенности ультраструктуры гепатоцитов, остающиеся мировым стандартом до настоящего времени. В печени различают строму и паренхиму, представленную эпителиальными клетками – гепатоцитами. Паренхимные клетки печени млекопитающих полигональной формы, на срезах они имеют неправильно-гексагональную форму с нечетко выраженными углами. Цитоплазматическая мембрана гепатоцита образует многочисленные выросты – микроворсинки, которые увеличивают функционально-активную площадь клетки. На рис. 1, *а* и *б* представлена ультраструктура гепатоцитов в норме. Они характеризуются округлыми ядрами, окруженными двумембранной оболочкой и прерывающими ее непрерывность ядерными порами. Ядра имеют ядрышки и зоны гетеро- и эухроматина. Цитоплазма содержит большое количество отдельных митохондрий,

Принятые сокращения: ВЭК – испытательный центр «Виварно-Экспериментальный Комплекс» ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»; ИВК – индивидуально вентилируемая клетка; НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; SPF статус – животные, свободные от специфических патогенов; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; агЭПР – агранулярный ЭПР; грЭПР – гранулярный ЭПР.

* Статья представлена главным редактором акад. В.П. Скулачёвым.

** Адресат для корреспонденции.

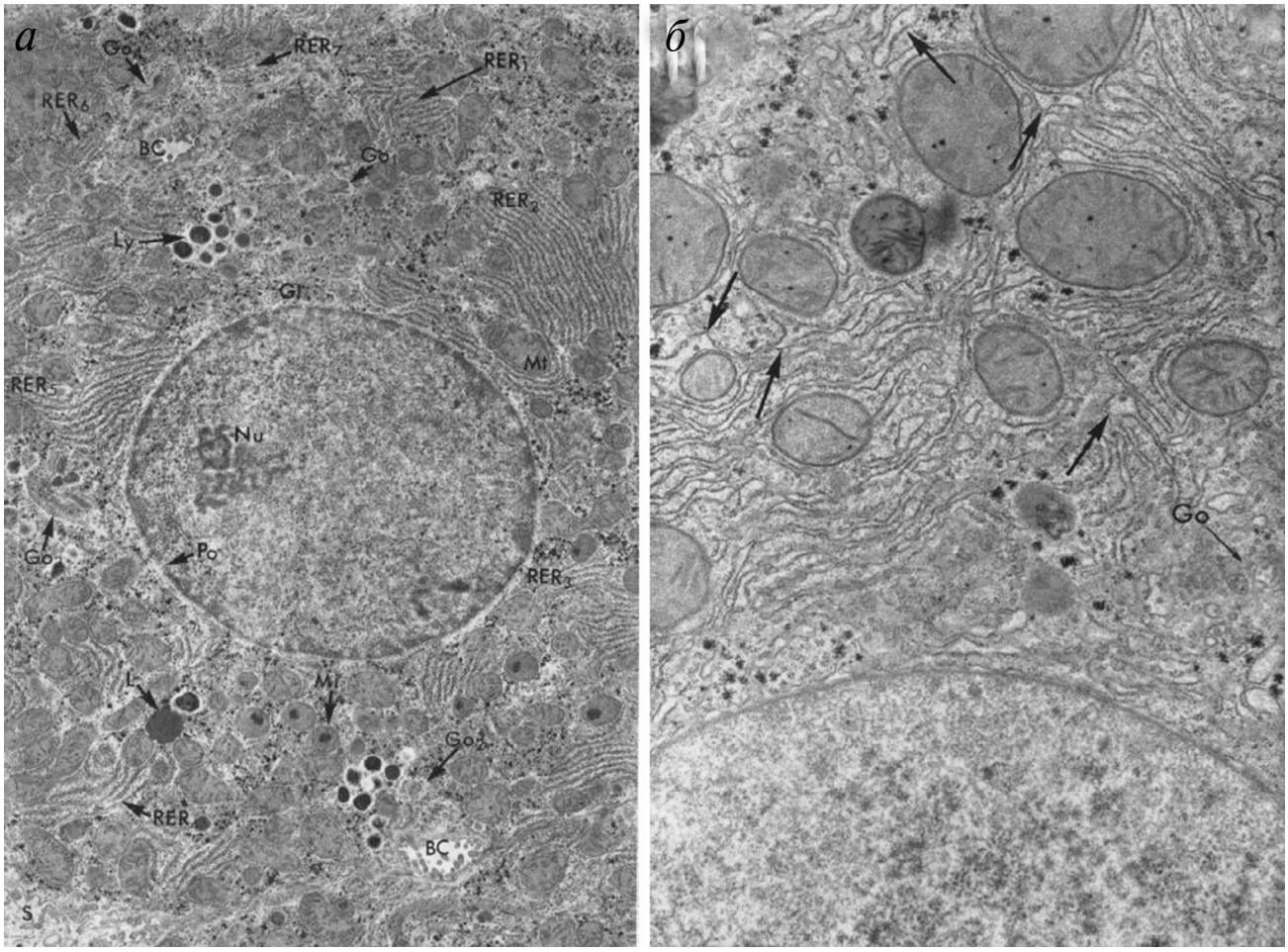


Рис. 1. Ультраструктура гепатоцитов, являющаяся общепринятым мировым стандартом (по Bruni и Porter [3]). *а* – Обзорная картина. (Nu) – ядро с ядерной порой (Po). В цитоплазме видны комплексы грЭПР (RER_1–RER_7), митохондрии (Mt), мембраны аппарата Гольджи (Go_1, Go_2, Go_3, Go_4), частицы гликогена (Gl), лизосомы (Ly), липидные включения (L), микротельца (Mi), желчные протоки (BC) и синусоид (S). Увеличение 10 200 ×; *б* – участок паренхимной клетки печени крысы при большем увеличении. Стрелками показаны цистерны грЭПР. (Go) – аппарат Гольджи. Увеличение 22 000 × (по Bruni и Porter [3])

много рибосом, гранулы гликогена и цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), простирающиеся по всей цитоплазме. Мембраны ЭПР всегда окружают митохондрии, которыми изобилует цитоплазма гепатоцитов (их число в одной клетки превышает 1000), а также контактируют с мембранами аппарата Гольджи [3]. ЭПР состоит из двух частей: зернистой (гранулярной) и гладкой (агранулярной). В норме гранулярная часть ЭПР гораздо более развита, чем агранулярная. Гранулярный ЭПР (грЭПР) имеет вид стопок (до 20) уплощенных цистерн, которые по отдельности имеют слегка изогнутую форму и расположены параллельно друг другу. ГрЭПР в клетках печени крысы непрерывен с агранулярным ЭПР (агЭПР). Мембраны агЭПР расположены вблизи цитоплазматической мембраны гепатоцитов.

Одна из важнейших функций гепатоцитов – детоксикация токсичных веществ – связана с агЭПР. Метаболизм углеводов также связан с агЭПР. В цистернах грЭПР синтезируются альбумины, фибриноген и глобулины плазмы крови; аппарат Гольджи отвечает за завершение синтетических процессов [4].

Известно, что любые изменения в работе гепатоцитов, в том числе вызванные развитием патологических процессов в организме, отражаются на состоянии ультраструктуры гепатоцитов. Так, при детоксикации токсических веществ, согласно литературным данным, агЭПР сильно разрастается, заполняя собой всю цитоплазму [4–8]. При этом после удаления токсических веществ избыток сети агЭПР уничтожается путем аутофагии [7]. При внепеченочном холестазе [6] после введения гепатотоксических

и канцерогенных веществ, таких как фенобарбитал [4], этионин [7] и дубильная кислота [8], наблюдается различная степень гипертрофии агЭПР. Многие из перечисленных соединений вызывают такие деструктивные изменения гепатоцитов, как увеличение просвета цистерн, потеря взаимнопараллельного расположения мембран грЭПР, набухание митохондрий. Показано, что гепатит С, вирусное инфекционное заболевание, поражающее печень, может развиваться бессимптомно годами, пока поражение печени не достигнет критического уровня [9]. При этом вирус гепатита С вызывает значительные изменения ультраструктуры гепатоцитов. В клетках развивается «цитоплазматическая диссоциация» – дистрофические изменения гепатоцитов: набухание клеток с разрежением цитоплазмы, набухание митохондрий, гиперплазия агЭПР, гипертрофия аппарата Гольджи и деструктивные изменения ядер [9, 10].

Одним из самых широко распространенных заболеваний печени в мире в настоящее время признан жировой гепатоз (стеатоз) или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – это состояние, при котором более 5% массы печени составляет жир, преимущественно триглицериды. НАЖБП прогрессирует до фиброза и цирроза печени [11]. Предполагают, что патогенез НАЖБП может быть связан с инсулинорезистентностью [12, 13]; развитие патологии возможно в результате использования неправильного рациона питания, в котором наблюдается преобладание жиров и углеводов. При НАЖБП в клетках паренхимы печени происходят значительные нарушения ультраструктуры гепатоцитов: накопление липидных включений, набухание митохондрий, нарушение структуры ЭПР [14–16]. В экспериментальных условиях НАЖБП вызывается при кормлении лабораторных животных сухими кормами с измененным составом – увеличенным содержанием холестерола и (или) фруктозы [14–16].

В настоящее время в отечественных виварий лабораторные животные получают стандартную лабораторную диету в виде сухих кормов преимущественно российских производителей. Состав кормов регламентируется госстандартом «ГОСТ Р 50258-92 от 1992 г.» [17]. В то время как в зарубежных кормах полностью регламентируется белковый, углеводный, жировой, микроэлементный и витаминный состав, включая состав аминокислот, российские производители указывают только сырье, из которого изготавливают корма. Это допускает наличие в корме неконтролируемых, не подлежащих мониторингу компонентов. При этом данных о детальных исследованиях состояния тканей контрольных лабораторных животных, потребляющих корма российских производителей, в том числе об ультраструктуре гепатоцитов, в литературе нет. Мы провели исследование ультраструктуры гепатоцитов лабораторных животных, питавшихся сухими кормами различных российских производителей в условиях различных вивариев, а также сравнение с ультраструктурой клеток печени мышей, получавших корм европейского производителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых мышах самцах, потреблявших различные виды кормов. В работе были использованы следующие животные:

– мыши гибриды F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса (животные свободные от специфических патогенов) в возрасте 3 мес. (n = 5), получавшие автоклавированный корм «Чара» (ООО «Ассортимент-АГРО», Россия), содержались в индивидуально вентилируемых клетках (ИВК) по 5–8 голов в каждой в условиях испытательного центра виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (ВЭК);

– мыши гибриды F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 1 мес. (n = 5), получавшие автоклавированный корм «ЛБК-120_106104» («Тосненский комбикормовый завод», Россия), содержались в ИВК по 5–8 голов в каждой в условиях ВЭК;

– мыши C57Bl/6 SPF статуса в возрасте 3 мес. (n = 3), получавшие автоклавированный корм «Чара» (ООО «Ассортимент-АГРО», Россия), содержались в ИВК по 5–8 голов в каждой в условиях вивария в лаборатории Трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова;

– мыши C57Bl/6 в возрасте 1 мес. (n = 3); конвенциональные животные содержались в комнате для передержки животных кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и получали лабораторный корм ООО «Лабораторкорм», Россия;

– мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес. (n = 5), питомник «Charles River» (Германия), поставщик в Россию – ООО «ЛБИ», получавшие корм фирмы «Altromin Spezialfutter» («GmbH&Co», Германия);

– мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 3 мес. (n = 5). Первый месяц жизни животные содержались в условиях питомника «Charies River» (Германия) и получали корм фирмы «Altromin Spezialfutter» (GmbH&Co, Германия);

второй и третий месяцы жизни мыши содержались в ИВК по 5–8 голов в каждой в условиях ВЭК, питались лабораторным кормом «ЛБК-120_106104» («Тосненский комбикормовый завод», Россия).

Корм и вода были предоставлены в свободном доступе, при световом режиме 12/12 и температуре воздуха 20–24 °С. В качестве подстила использовали деревянную щепу Safe BK 8/15 («JRS», Германия). Все материалы, поступавшие к животным, содержавшимся в ИВК, были стерилизованы. Эвтаназию мышей проводили декапитацией, отбор и фиксацию тканей проводили в течение 1 мин после декапитации.

Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировали раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (концентрация 3%), pH 7,4 в течение 2 ч при 4 °С; затем дофиксировали 1%-ным раствором четырёхокиси осмия в фосфатном буфере в течение 1,5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта – 50; 60; 70; 96 и 100%. Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали алмазным ножом на ультрамикротоме Leica ULTRACUT UCT («Leica», Германия). Срезы контрастировали в цитрате свинца по методу Reynolds [18]. Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-1400 («Jeol», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлена обзорная картина ультраструктуры гепатоцитов мышей гибридов F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшихся в ИВК в условиях ВЭК и получавших автоклавированный корм «Чара». Можно видеть, что общая структура паренхимной ткани печени не нарушена. Отсутствуют признаки набухания, мембраны клеток гепатоцитов плотно прилегают друг к другу, видны желчные канальцы. В клетках присутствуют жировые капли, но их число невелико. Однако при отсутствии признаков нарушения общей структуры паренхимной ткани параметры внутренней ультраструктуры гепатоцитов значительно отличались от установленных в классических работах стандартов. На рис. 2 показаны обширные пространства внутри клеток, «свободные» от органелл, все клеточные органеллы оказываются зажаты между электронно-светлыми областями. На рис. 3 при большем увеличении видно, что

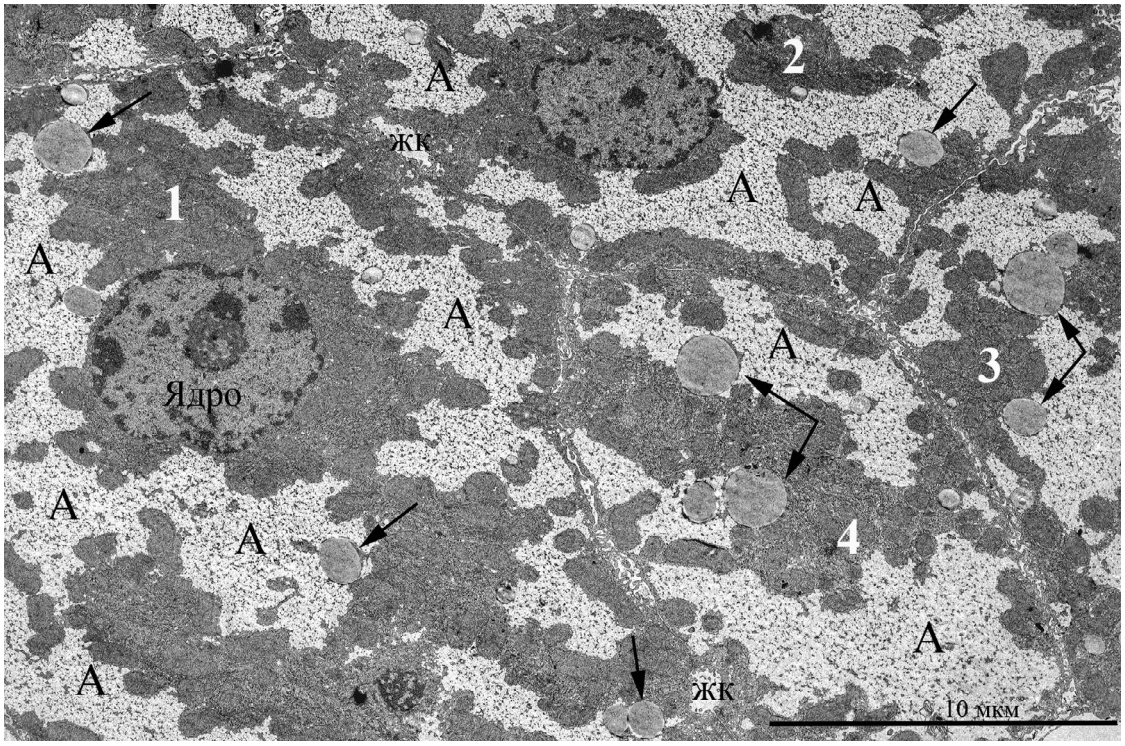


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов мыши гибрида F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся в ИВК в условиях ВЭК и получавшей автоклавированный корм «Чара». На фотографии можно видеть 4 гепатоцита (показаны цифрами 1–4). Стрелками показаны жировые капли. В клетках видны обширные пространства внутри клеток, заполненные аморфным веществом (А); ЖК – желчный каналец

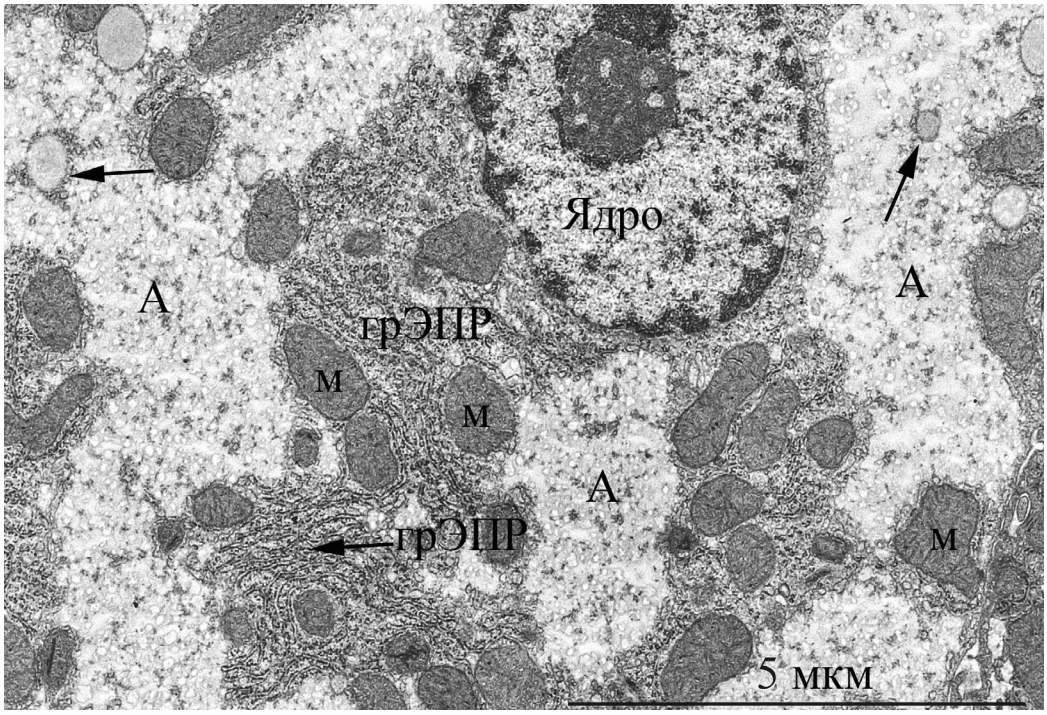


Рис. 3. Фрагмент паренхимной клетки печени мыши гибрида F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся в ИВК в условиях ВЭК и получавшей автоклавированный корм «Чара». Митохондрии продолговатой или округлой формы (М), окруженные хаотично расположенными мембранами грЭПР, зажаты между электронно-светлыми областями, заполнены аморфным веществом (А). Стрелками показаны жировые капли

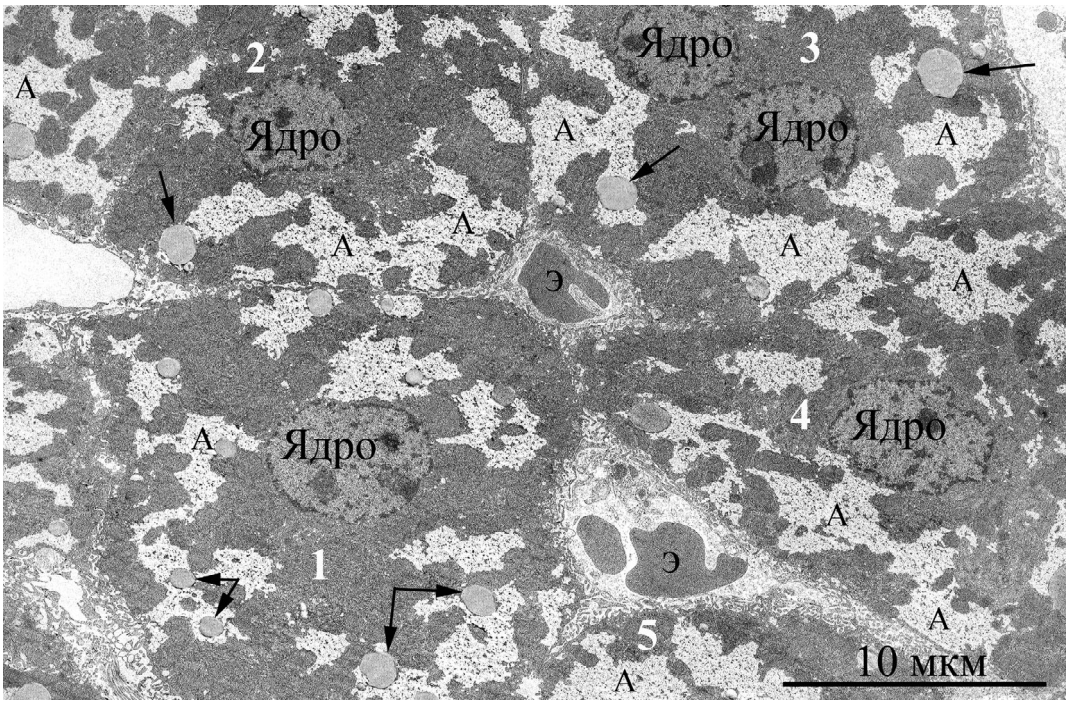


Рис. 4. Обзорная фотография гепатоцитов мыши C57Bl/6 SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся в условиях в лаборатории Трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и получавшей лабораторный корм «Чара». Видны 5 паренхимных клеток печени (показаны цифрами 1–5), расположенные между ними капилляры с эритроцитами (Э) внутри. Во всех гепатоцитах присутствуют свободные от клеточных органелл электронно-светлые области (А). Стрелками показаны жировые капли

эти участки заполнены аморфным веществом и не являются результатом набухания. При этом внутренняя ультраструктура цитоплазматических органелл соответствует норме: можно видеть многочисленные митохондрии продолговатой или округлой формы, окруженные мембранами грЭПР. Комплексы мембран грЭПР расположены хаотично и сконцентрированы вокруг митохондрий.

Кроме мышей, содержавшихся в условиях ВЭК, мы исследовали ультраструктуру гепатоцитов мышей C57Bl/6 SPF статуса, содержавшихся в условиях вивария в лаборатории Трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и получавших тот же лабораторный корм «Чара». На рис. 4 видно, что у этой группы животных общая структура паренхимной ткани также не нарушена, хорошо видны границы соседних гепатоцитов, видны эндотелиальные клетки капилляров. Однако и у этих животных во всех гепатоцитах присутствуют свободные от клеточных органелл электронно-светлые области. Как и в предыдущей группе животных, все внутриклеточные органеллы оказываются зажаты в узких тяжах цитоплазмы, расположенных между этими обширными зонами, заполненными аморфным веществом. Таким образом, у мышей SPF статуса, потреблявших корм «Чара», вне зависимости от места содержания, внутренняя ультраструктура гепатоцитов печени была значительно нарушена.

В дальнейших исследованиях мы снизили возраст исследуемых мышей и изменили лабораторный корм, получаемый животными. Мы взяли образцы печени у мышей гибридов F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте не 3, а 1 мес., содержавшихся в ИВК в условиях ВЭК и получавших автоклавированный корм «ЛБК-120_106104». Также как и у предыдущих групп животных, у этих мышей на малом увеличении можно было видеть, что общая структура ткани печени не нарушена. Как и в предыдущих группах животных, в ткани печени отсутствовали признаки набухания. Однако на большем увеличении видно, что гепатоциты мышей, получавших корм «ЛБК-120_106104», также как и предыдущие группы мышей, имеют существенные отличия от классических представлений о структуре паренхимных клеток печени в норме (рис. 5). В гепатоцитах присутствуют свободные от органелл пространства, заполненные электронно-светлым аморфным содержимым. Митохондрии продолговатой и округлой формы с немногочисленными кристами окружены комплексами мембран грЭПР, не имеющими правильной упаковки.

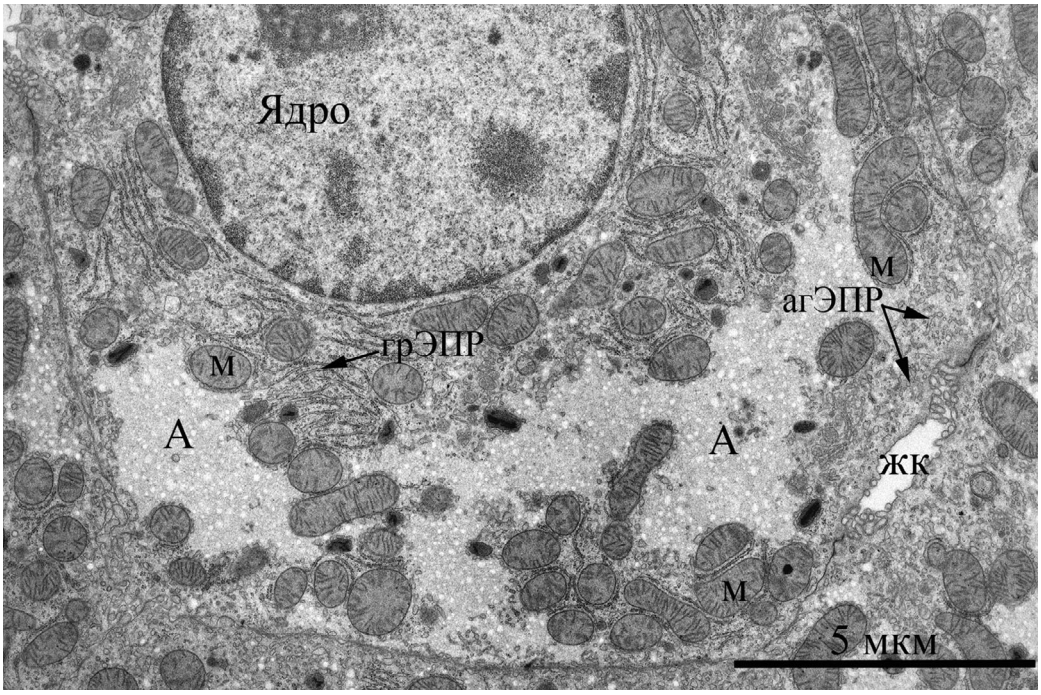


Рис. 5. Особенности внутренней ультраструктуры гепатоцита мыши гибрида F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 1 мес., содержавшейся в условиях ВЭК и получавшей автоклавированный корм «ЛБК-120_106104». Видны свободные от органелл пространства, заполненные электронно-светлым аморфным содержимым (А). Митохондрии продолговатой и округлой формы с немногочисленными кристами (М) окружены комплексами мембран грЭПР, на периферии клетки можно видеть мембраны агЭПР. ЖК – желчный каналец

У конвенциональных мышей C57Bl/6 в возрасте 1 мес., содержавшихся в комнате передержки биологического факультета МГУ и получавших лабораторный корм ООО «Лабораторкорм», выявлены значительные изменения внутренней ультраструктуры гепатоцитов, полностью совпадающие с описанными выше (рис. 6).

С целью проверки предположения о влиянии корма на структуру гепатоцитов мы исследовали образцы печени мышей стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес., полученных непосредственно из питомника «Charies River». Животные исследованной нами группы получали только корм фирмы «Altromin Spezialfutter». Ультраструктура гепатоцитов таких мышей соответствовала общепринятым электронно-микроскопическим данным. На рис. 7 представлена ультраструктура гепатоцитов этой группы мышей на малом увеличении. Видно, что гепатоциты имеют неправильно-гексагональную форму, равномерно заполнены цитоплазматическим содержимым. Округлые ядра расположены в центральной части гепатоцита, цитоплазма клеток изобилует органеллами. На рис. 8 – ультраструктура гепатоцита на большем увеличении. Многочисленные митохондрии овальной или округлой формы равномерно расположены по всей цитоплазме гепатоцита. Хорошо развит грЭПР: видны стопки параллельно расположенных мембран с находящимися на наружной мембране многочисленными осмиофильными гранулами диаметром 12–15 нм – рибосомами. Мембраны агЭПР находятся вблизи плазматической мембраны гепатоцита.

После прибытия из питомника «Charies River» в возрасте 1 мес. (статус SPF) оставшиеся мыши данной группы содержались в течение 2 мес. в ИВК в условиях ВЭК, где питались лабораторным кормом «ЛБК-120_106104». В возрасте 3 мес. нами были взяты образцы печени таких животных. Как видно из рис. 9, у таких животных за 2 мес. развивались значительные нарушения внутренней ультраструктуры гепатоцитов, соответствующие деструктивным изменениям, выявленным у других животных, содержавшихся на кормах отечественных производителей (рис. 2–6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, наше исследование показало, что у всех групп лабораторных мышей, содержавшихся в различных вивариях в г. Москва и получавших питание в виде сухого корма отечественных производителей, развиваются значительные патологические изменения во внутренней ультраструктуре гепатоцитов. При этом нарушения в ультраструктуре клеток печени наблюдаются вне зависимости от статуса животного (SPF или конвенциональные), вне зависимости от условий вивария, а также вне зависимости от производителя корма (аналогичные результаты были получены нами и для крыс Wistar). При этом ультраструктурное исследование гепатоцитов печени мышей, содержавшихся в питомнике «Charles River» и получавших корм «Altromin Spezialfutter», не выявило патологических нарушений во внутренней ультраструктуре клеток. Однако если этих мышей в дальнейшем переводили на корм, произведенный в России, нарушения структуры клеток печени развивались уже через 2 мес.

Следует отметить, что в настоящее время в достаточном числе работ по исследованию печени приводятся электронно-микроскопические фотографии. При этом на контрольных фотографиях гепатоцитов здоровых особей в отдельных работах можно видеть изменения, аналогичные найденным нами. Более того, картина гепатоцитов с деструктивными признаками приводится в качестве контроля не только в работах, выполненных на лабораторных животных, но и на человеке. Так, в работе Falconet et al. проводилось исследование ультраструктуры гепатоцитов людей с хроническим гепатитом С [10]. Видно, что на контрольной фотографии гепатоцита, полученного из материала биопсии здорового человека, присутствуют обширные пространства внутри клеток, «свободные» от органелл, заполненные аморфным веществом, грЭПР и митохондрии оказываются зажаты в узких тяжах цитоплазмы. В работе Silva et al. проводилось исследование изменений печени при развитии стеатоза у детей [19]. В качестве контрольной группы также были взяты дети в возрасте от 1 года до 14 лет с нормальным физическим развитием. Однако и в этом случае на представленных контрольных электронно-микроскопических фотографиях гепатоцитов можно видеть в клетках пространства свободные от органелл и значительные изменения цитоплазматического содержимого. Таким образом, даже у людей без явных признаков патологии выявляются аналогичные деструктивные изменения в печени. Можно предположить, что такие нарушения могут быть связаны с неправильным питанием.

Ультраструктурные нарушения гепатоцитов, соответствующие описанным нами, в литературе встречаются в работах по исследованию действия диет с высоким содержанием жиров и сахара на животных. Так, в статье Dallak et al. [14], выполненной на крысах Sprague-Dawley, показано, что диета с высоким содержанием хо-

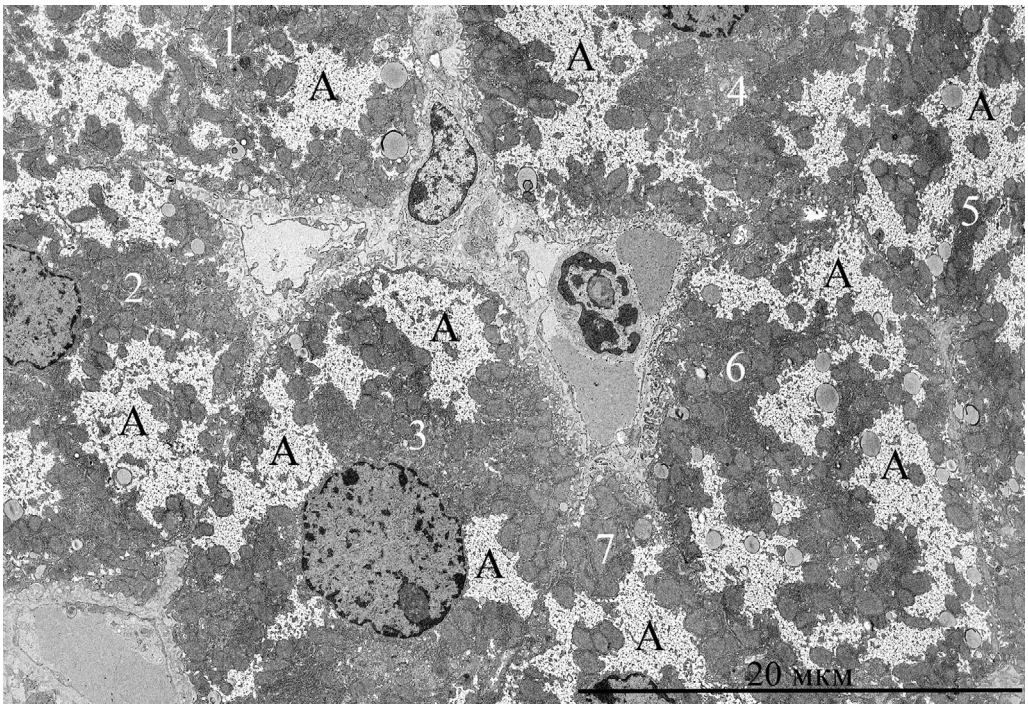


Рис. 6. Обзорная фотография гепатоцитов конвенциональной мыши C57Bl/6 в возрасте 1 мес., содержавшейся в комнате передержки биологического факультета МГУ и получавшей лабораторный корм ООО «Лабораторкорм». Видны 7 паренхимных клеток печени (показаны цифрами 1–7) и расположенные между ними капилляры. Электронно-светлые области (А) присутствуют во внутреннем пространстве всех гепатоцитов

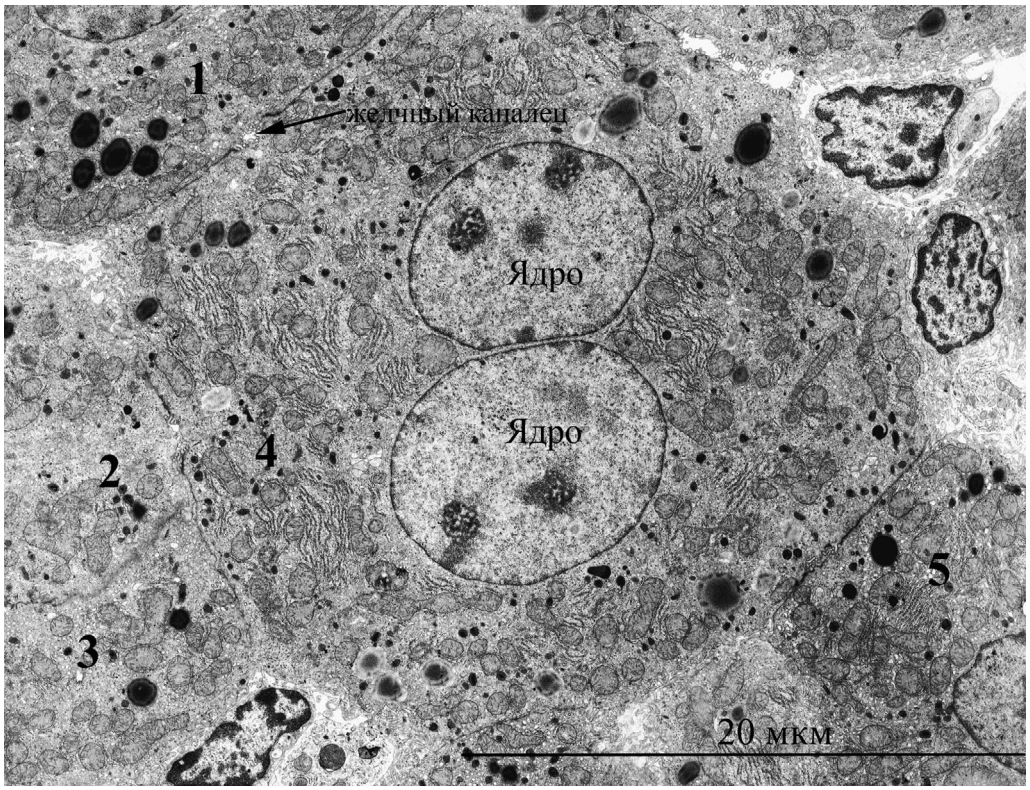


Рис. 7. Ультраструктура гепатоцитов печени мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес., содержавшейся в условиях питомника «Charies River» и получавшей корм фирмы «Altromin Spezialfutter». 5 гепатоцитов обозначены цифрами 1–5. Округлые ядра расположены в центральной части гепатоцита

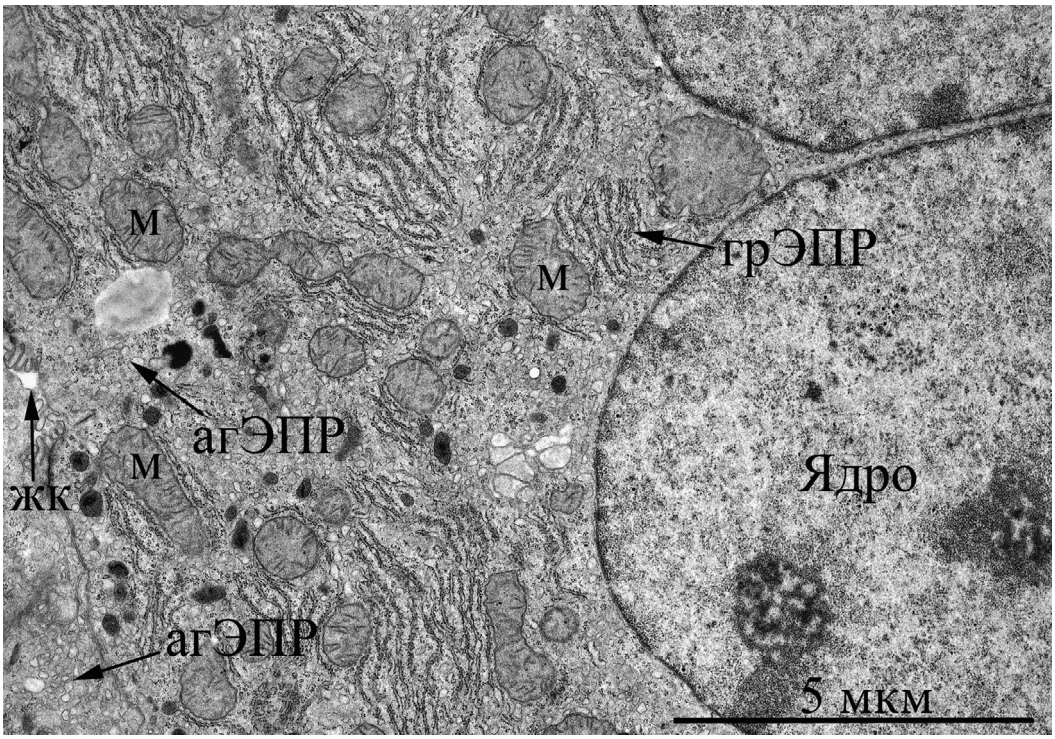


Рис. 8. Внутренняя ультраструктура гепатоцита мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес., содержавшейся в условиях питомника «Charies River» и получавшей корм фирмы «Altromin Spezialfutter». Митохондрии овальной или округлой формы (М) равномерно расположены по всей цитоплазме гепатоцита. Видны стопки параллельно расположенных мембран грЭПР. Мембраны агЭПР находятся вблизи плазматической мембраны гепатоцита. ЖК – желчный каналец

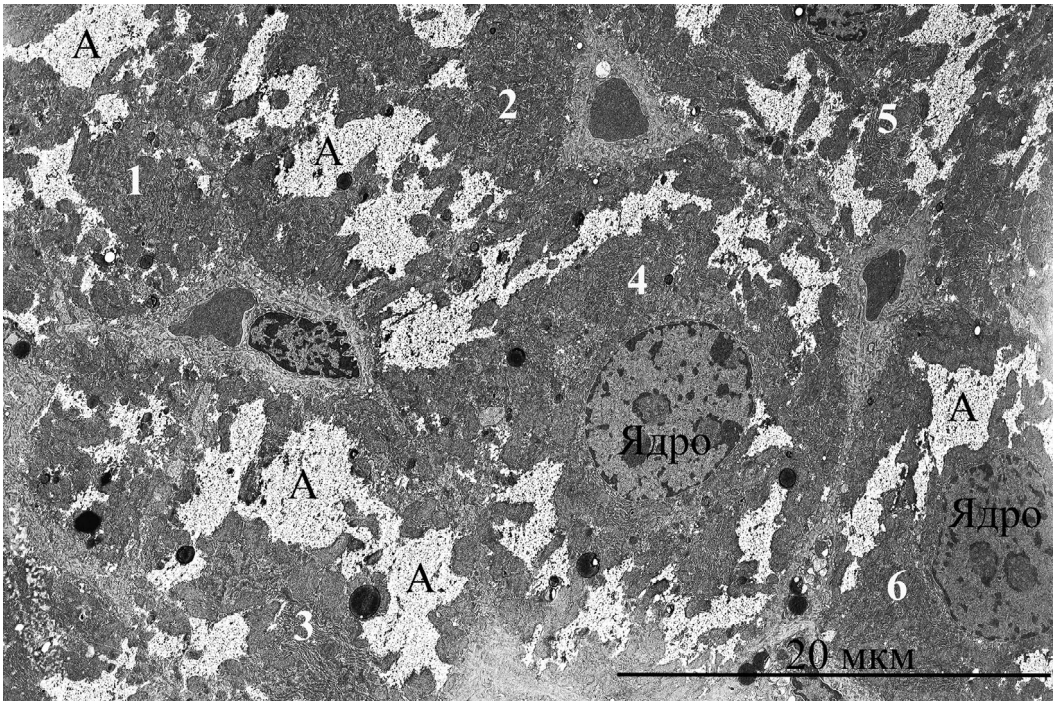


Рис. 9. Ультраструктура гепатоцитов печени мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся первый месяц жизни в условиях питомника «Charies River» и получавшей корм фирмы «Altromin Spezialfutter» и далее в течение 2 мес. – в условиях ВЭК, получавшей корм «ЛБК -120_106104». На фотографии 6 гепатоцитов обозначены цифрами 1–6. Во всех гепатоцитах присутствуют свободные от клеточных органелл электронно-светлые области, заполненные аморфным веществом (А)

лестерола и глюкозы [20] в течение 15 недель приводила к значительным нарушениям в ультраструктуре гепатоцитов. Авторы интерпретируют появление в клетках пространств, свободных от органелл, как расширение (набухание) эндоплазматического ретикулума и «пузырение» (blebbing) мембран клетки. Однако в нашей работе при анализе внутренней ультраструктуры гепатоцитов на больших увеличениях (рис. 3), которые отсутствуют в работе Dallak et al., мы не видели никаких мембранных образований в участках клеток, свободных от органелл, а также набухания клеточных органелл.

В работе Silva-Veiga et al. у мышей C57Bl/6, получавших в течение 14 недель высококалорийную диету (5000 ккал/кг) [16], а также в работе Abo El-khair et al. [15] у крыс Sprague-Dawley, получавших высокожирную диету [21], на представленных в статьях фотографиях можно видеть изменения ультраструктуры гепатоцитов, сходные с описываемыми нами. При этом в контрольных группах животных, представленных в исследованиях Silva-Veiga et al. [16] и Abo El-khair et al. [15], ультраструктура паренхимных клеток печени соответствует классическим представлениям [3]. Следует отметить, что при развитии жирового стеатоза у животных, получавших высокожирную диету, авторы описывали увеличение гепатоцитов в размерах, значительные повреждения ядра и митохондрий, появление многочисленных жировых капель. Ни одного из этих признаков в нашей работе не найдено. Анализ имеющейся литературы позволяет предположить, что у контрольных мышей, исследованных в нашей работе и получавших корма российских производителей, жировой гепатоз не развивается, однако патологические изменения в печени, связанные с кормом, присутствуют. Одним из основных направлений лечения жирового гепатоза у людей является назначение предложенной Мануилом Певзнером диеты № 5 с содержанием животных белков до 100–120 г/сут, ограниченным количеством жиров, обогащенной лиотропными питательными веществами (творог, гречневая, пшеничная мука), витаминами и микроэлементами [22]. До повсеместного введения сухих кормов в рацион лабораторных животных именно эта диета и лежала в основе питания крыс и мышей. Shichali-Belouic et al. проведено исследование, в котором дневные песчанки (*Psammomys obesus*), отловленные в дикой природе в полупустыне Алжира, были переведены на стандартную лабораторную диету [23]. Авторами показано, что через 9 мес. у таких животных развивается стеатоз, сопровождающийся значительными деструктивными изменениями в ультраструктуре гепатоцитов. Полученные авторами результаты заставляют задуматься об общепринятых стандартах в отношении сухих кормов, поскольку некоторые стандартные лабораторные диеты могут не соответствовать потребностям организма конкретного вида животных. Таким образом, нами показано, что при кормлении лабораторных животных (мышей и крыс) сухими кормами отечественных производителей, широко используемыми в нашей стране, в клетках печени развиваются значительные деструктивные изменения.

Полученный результат выявляет необходимость подробного и полного исследования состава кормов (при параллельном контроле цитологических, физиологических, биохимических и других параметров тканей лабораторных животных, потребляющих эти корма) с целью определения корректной диеты, необходимой для полноценного содержания животных в вивариях. Представляется, что эти данные имеют особое значение при экспериментальных исследованиях функциональных характеристик клеточных органелл гепатоцитов лабораторных животных, так как ультраструктурные перестройки, как известно, отражают изменения в метаболических процессах в клетке, в ткани и в целом организме.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00578) и выполнена при поддержке ЦИТИС (грант № АААА-А19-119012490166-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dalton, A. J., Kahler, H., Striebich, M. J., and Lloyd, B. (1950) Finer structure of hepatic, intestinal and renal cells of the mouse as revealed by the electron microscope, *J. Natl. Cancer Inst.*, **11**, 439-461.
2. Fawcett, D. W. (1955) Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **15**, 1475-1503.
3. Bruni, C., and Porter, K. R. (1965) The Fine structure of the parenchymal cell of the normal rat liver: I. general observations, *Am. J. Pathol.*, **46**, 691-755.
4. Jones, A. L., and Fawcett, D. W. (1966) Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 215-232.

5. Remmer, H., and Merker, H. J. (1965) Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes, *Ann. NY Acad. Sci.*, **123**, 79-97.
6. Steiner, J. W., Carruthers, J. S., and Kalifat, S. R. (1962) Observations on the fine structure of rat liver cells in extrahepatic cholestasis, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **58**, 141-159.
7. Wood, R. L. (1965) The fine structure of hepatic cells in chronic ethionine poisoning and during recovery, *Am. J. Pathol.*, **46**, 307-330.
8. Arhelger, R. B., Broom, J. S., and Boler, R. K. (1965) Ultrastructural hepatic alterations following tannic acid administration to rabbits, *Am. J. Pathol.*, **46**, 409-434.
9. Wieczorek, A., Stępień, P. M., Zarębska-Michaluk, D., Kryczka, W., Pabjan, P., and Król, T. (2017) Megamitochondria formation in hepatocytes of patient with chronic hepatitis C – a case report, *Clin. Exp. Hepatol.*, 3, 169-175.
10. Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Chinea, G., Gavilondo, J., de la Rosa, M. C., Menéndez, I., Dueñas-Carrera, S., Viña, A., García, W., Gra, B., Noa, M., Reytor, E., Barceló, M. T., Alvarez, F., and Morales-Grillo, J. (2003) Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 1085-1090.
11. Zhang, X. Q., Xu, C. F., Yu, C. H., Chen, W. X., and Li, Y. M. (2014) Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 1768-1776.
12. Cali, A. M., Zern, T. L., Taksali, S. E., de Oliveira, A. M., Dufour, S., Otvos, J. D., and Caprio, S. (2007) Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proatherogenic state, *Diabetes Care*, **30**, 3093-3098.
13. FonTacer, K., and Rozman, D. (2011) Nonalcoholic fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation, *J. Lipids*, **2011**, 783976.
14. Dallak, M. A., Bin-Jaliah, I., Albawardi, A., Haidara, M. A., Sakr, H. F., Eid, R. A., Hassan, W. N., and Al-Ani, B. (2018) Swim exercise training ameliorates hepatocyte ultrastructural alterations in rats fed on a high fat and sugar diet, *Ultrastruct. Pathol.*, **42**, 155-161.
15. Abo El-Khair, S. M., Ghoneim, F. M., Shabaan, D. A., and Elsamanoudy, A. Z. (2020) Molecular and ultrastructure study of endoplasmic reticulum stress in hepatic steatosis: role of hepatocyte nuclear factor 4α and inflammatory mediators, *Histochem. Cell Biol.*, **153**, 49-62.
16. Silva-Veiga, F. M., Rachid, T. L., de Oliveira, L., Graus-Nunes, F., Mandarim-de-Lacerda, C. A., and Souza-Mello, V. (2018) GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice, *Mol. Cell Endocrinol.*, **474**, 227-237.
17. ГОСТ Р 50258-92 (1992) Комбикорма полнорационные для лабораторных животных, Технические условия, Изд. стандартов, с. 8
18. Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **17**, 208-212.
19. Silva, G. H., Hessel, G., Coelho, K. I., and Escanhoela, C. A. (2011) Steatosis of indeterminate cause in a pediatric group: is it a primary mitochondrial hepatopathy? *Sao Paulo Med J.*, **129**, 217-223.
20. Aragno, M., Tomasinelli, C. E., Vercellinatto, I., Catalano, M. G., Collino, M., Fantozzi, R., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2009) SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructosein rats, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1067-1074.
21. Meli, R., MattaceRaso, G., Irace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., Pagano, T. B., Calignano, A., Colonna, A., and Santamaria, R. (2013) High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats, *PLoS One*, **8**, e66570.
22. Певзнер М. И. (1958) *Основы лечебного питания* (под ред. Ачаркана А. И. и Маршака М. С.). Медгиз, Москва, с 582.
23. Sihali-Beloui, O., Aroune, D., Benazouz, F., Hadji, A., El-Aoufi, S., and Marco, S. A. (2019) A hypercaloric diet induces hepatic oxidative stress, infiltration of lymphocytes, and mitochondrial reshuffle in *Psammomys obesus*, a murine model of insulin resistance, *C R Biol.*, **342**, 209-219, doi: 10.1016/j.crvi.2019.04.003.

ULTRASTRUCTURE OF HEPATOCYTES IN LABORATORY MICE WHEN KEEPING ANIMALS ON A STANDARD DRY LABORATORY DIET*

V. B. Vays[1], I. M. Vangeli[1], O. A. Averina[1], M. L. Lovat[2], and L. E. Bakeyeva[1]**

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia*

Received July 7, 2020
Revised July 7, 2020
Accepted July 18, 2020

The significant destructive changes in ultrastructure of hepatocytes from laboratory mice kept in different vivariums in Moscow and fed with dry laboratory animal diets acquired from different domestic manufacturers that were not standardized for initial products were demonstrated using electron microscopy. Furthermore, disruption in the ultrastructure of liver parenchymal cells occurred regardless of the animal status (SPF or conventional), conditions of various vivariums, as well as the feed manufacturer. At the same time, studies on ultrastructure of liver hepatocytes from mice kept in the Charles River Laboratory facilities in Germany and fed with the Altromin Spezialfutter laboratory animal diet (GmbH & Co, Germany) that was produced using quality control of ingredients did not reveal destructive changes in the internal ultrastructure of hepatocytes. However, if these mice were later fed with the food produced in local manufactures, changes in the structure of liver cells developed after 2 months. Thus, feeding with dry diet from the domestic producers of an unspecified composition causes significant changes in the ultrastructure of hepatocytes in control animals, reflecting the development of some pathological processes in the body.

Keywords: mitochondria, hepatocytes, ultrastructure, mice, standard laboratory diet

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1305 – 1320

УДК 577.152.3

ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА ИЗ СЕМЯН ЛЬНА ОБЛАДАЕТ СИЛЬНЫМ АНТИКОАГУЛЯНТНЫМ, АНТИТРОМБОЦИТАРНЫМ ДЕЙСТВИЕМ И СПОСОБНА РАСТВОРЯТЬ ТРОМБЫ

© 2020 Ш.К.М. Нандиш[1], Дж. Кенгайя[1], Чх. Рамачандрайя[1], Чандрамма[1], А. Шиваия[1], С.М. Сантош[2], Тирунавуккарасу[3], Д. Саннанингая[1]*

[1] *Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com*

[2] *Department of Medicinal Biochemistry and Microbiology (IMBM), Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden*

[3] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Pondicherry University, 605014 Pondicherry, Tamil Nadu, India*

Поступила в редакцию 21.03.2020
После доработки 26.05.2020
Принята к публикации 29.05.2020

В настоящем исследовании была выделена, очищена и охарактеризована цистеиновая протеаза из семян льна (FSCP – flax seed cysteine protease), которая обладает выраженными антикоагулянтными и антитромбоцитарными свойствами и способна растворять образовавшиеся сгустки крови. Эта протеаза была очищена до гомогенного состояния с использованием комбинации методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Чистота полученного препарата была подтверждена методами SDS-PAGE, RP-HPLC и MALDI-TOF. Согласно результатам SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и в отсутствие восстановителей, в препарате FSCP присутствовала одна чётко выраженная белковая полоса с молекулярной массой ~160 кДа. Точное значение молекулярной массы FSCP, установленное с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF, оказалось равным 168 кДа. Спектры кругового дихроизма белка FSCP указывают на присутствие в структуре этого белка 25,6% спиральных структур, 25,8% структур типа «поворот» и 48% структур типа «случайный клубок» и на отсутствие бета-складчатой структуры. FSCP гидролизует как казеин, так и желатин с удельной активностью 3,5 и 4,2 ед./мг·мин соответственно. Протеолитическая активность FSCP полностью отменялась при добавлении йодоуксусной кислоты, что позволяет предположить, что FSCP является представителем семейства цистеиновых протеаз. Было обнаружено, что оптимальные значения pH и температуры для протеолитической активности FSCP равны pH 6,0 и 30 °C соответственно. FSCP демонстрировала сильную антикоагулянтную активность как в препаратах обогащённой тромбоцитами плазмы, так и в случае плазмы, бедной тромбоцитами, вызывая удлинение времени образования сгустков от 222 до 1100 с и от 256 до 1210 с соответственно. FSCP вызывал деградацию фибриногена человека и фибриновых сгустков. Конечные продукты деградации фибриногена в результате действия тромбина и FSCP были разными. Более того, FSCP ингибировал агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцируемую ADP, эпинефрином, тромбином, коллагеном, арахидоновой кислотой и фактором активации тромбоцитов. Было обнаружено, что FSCP нетоксичное соединение, так как не повреждает мембрану эритроцитов и не вызывает кровоизлияния и отеков у экспериментальных мышей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цистеиновая протеаза, антикоагулянт, антитромбоцитарный, нетоксичный.

DOI: 10.31857/S0320972520090109

ВВЕДЕНИЕ

Семена льна являются хранилищем множества химических соединений растительного происхождения, включая белки, в том числе и ферменты, а также липиды, углеводы и вторичные метаболиты, которые можно использовать для различных фармакологических целей [1]. В растениях протеолитические ферменты участвуют в различных процессах – от стадии про-

Принятые сокращения: ADP – аденозиндифосфат; APTT – активированное частичное тромбопластиновое время; КД – круговой дихроизм; DEAE – диэтиламиноэтил; EDTA – этилендиаминтетраацетат; FSCP –цистеиновая протеаза семян льна; FSBE – буферный экстракт семян льна, IAA – йодоуксусная кислота; PAF – фактор активации тромбоцитов; PMSF – фенилметилсульфонилфлуорид; PPP – плазма с низким содержанием тромбоцитов; PRP – плазма, обогащённая тромбоцитами; PT –протромбиновое время; RP-HPLC – обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; TFA – трифторуксусная кислота; TCA – трихлоруксусная кислота.

* Адресат для корреспонденции.

растания семян до гибели клеток [2]. Кроме того, они имеют множество промышленных применений в пищевой промышленности, пивоварении, при приготовлении сыров и смягчении мяса, в хлебобулочной промышленности, кожевенной и текстильной промышленностях [3]. Однако, в отличие от действия протеолитических ферментов из ядов змей, пчёл и пауков [4], влияние растительных протеаз на гемостаз изучено слабо. Протеолитические ферменты, которые обладают прокоагулянтными свойствами и могут вызвать деградацию молекулы фибриногена с её *N*-конца, образуя фибринопептиды А и Б, сходны с тромбин-подобными ферментами, активаторами протромбина, фактора X и V [5]. Протеазы, которые обладают антикоагулянтной активностью и вызывают деградацию фибриногена с его *C*-конца, вызывая образование укороченного фибриногена, не способного к полимеризации, являются как активаторами белка C, так и ингибиторами факторов IX и X [6]. Протеазы, которые способны вмешиваться в процессы функционирования тромбоцитов, действуют одновременно как активаторы и как ингибиторы процесса агрегации тромбоцитов [7]. Также сообщалось, что ферменты, вызывающие деградацию фибриногена, активируют плазминоген и вызывают кровоизлияние у экспериментальных животных [8]. Наиболее широко изучены металлопротеазы и сериновые протеазы из ядов гадюк и кроталидов, которые обладают способностью деградировать фибриноген и фибрин и демонстрируют про- и антикоагулянтную активность [9]. В то же время цистеиновые протеазы животных клеток недостаточно хорошо изучены. С другой стороны, несколько групп ученых описали цистеиновые протеазы из латекса различных видов растений, таких как *Asclepius curassavica, Pergularia extensa, Calotropis gigantean, Synadenium grantii, Wrightia tinctoria* [10]. Было обнаружено, что сырой латекс препятствует гемостазу, проявляя прокоагулянтные, тромбоиндуцирующие или растворяющие сгустки свойства. Было показано, что фуцин (цистеиновая протеаза из *Ficus carica*) может активировать фактор X и вызывать образование сгустков [11]. Папаин был первой охарактеризованной цистеиновой протеазой из латекса *Carica papaya* [12]. Однако цистеиновые протеазы из съедобных семян изучены в меньшей степени. Лишь недавно появились сообщения о присутствии цистеиновой протеазы в буферном экстракте семян льна и о её антикоагулянтной, антитромбоцитарной и растворяющей тромбы активностях [13]. Очистка и описание свойств фермента имеют большое значение для понимания структурно-функциональных взаимосвязей и предсказания его возможного практического применения. Основной целью настоящей работы являлась очистка фермента с максимальным выходом продукта с наивысшей каталитической активностью. Кроме того, анализ свойств полученного фермента обеспечивает комплексное понимание об аллостерических эффектах, возможностях белковой инженерии и нового дизайна лекарств. В связи с этим мы очистили и охарактеризовали цистеиновую протеазу из буферного экстракта семян льна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: свободный от липидов казеин, желатин, фенилметилсульфонилфлуорид (PMSF), этилендиаминтетрацетат (EDTA), йодоуксусная кислота (IAA), аденозиндифосфат (ADP), эпинефрин, тромбин, арахидоновая кислота, фактор активации тромбоцитов (PAF), коллаген, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-25, фибриноген плазмы крови человека и 1,10-фенантролин были приобретены в компании «Sigma», США. Набор белков-маркеров молекулярной массы был приобретен в компании «Bangalore Genie Pvt Ltd.», Индия. Реагенты для определения активированного частичного тромбопластинового времени (APTT) (LIQUICELIN-E Phospholipids preparation derived from rabbit brain with ellagic acid) и протромбинового времени (PT) (UNIPLASTIN rabbit brain thromboplastin) были приобретены в компании «AGAPPE Diagnostic Pvt Ltd.», Индия. Все другие реактивы, использованные в настоящей работе, были аналитической чистоты. Для проведения анализа плазмы, обогащённой тромбоцитами (PRP), и плазмы с пониженным содержанием тромбоцитов (PPP) использовали свежесобранную кровь от здоровых доноров.

Получение буферного экстракта семян льна (FSBE – flax seed buffer extract) и определение концентрации общего белка. Семена льна были приобретены на местном рынке в г. Тумкур. Семена промывали дважды дистиллированной водой и обрабатывали в течение 1 ч 0,5 M $NaHCO_3$ в соотношении 1 : 8 (*w*/*v*) при постоянном перемешивании. Затем удаляли клейковину, фильтруя экстракт через муслиновую ткань. Семена промывали и тщательно высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Далее высушенные семена измельчали в порошок, который повторно суспендировали в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,6 и центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин. Супернатант собирали и храни-

ли при –20 °C до дальнейшего использования. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [14], используя в качестве белкового стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Гель-фильтрация на колонке с Sephadex G-100. Колонка с Sephadex G-100 (1,0 × 62 см) была предварительно уравновешена 0,1 M NaCl. 100 мг FSBE в 1 мл 0,1 M NaCl наносили на колонку. Элюцию белка проводили с помощью раствора 0,1 M NaCl при скорости потока 0,25 мл/мин. Мониторинг элюции проводили с помощью регистрации поглощения при 280 нм. В каждой второй пробирке определяли протеолитическую активность, регистрируя поглощение при 660 нм, используя в качестве субстрата казеин, не содержащий примесей жиров. Фракции с выраженной протеолитической активностью лиофилизировали и использовали для дальнейших анализов.

Хроматография на колонке с DEAE-Sephadex A-25. Фракции, соответствующие пику II (20 мг белка в 1 мл уравновешивающего буфера), полученные во время предыдущей стадии очистки, наносили на колонку с DEAE-Sephadex A-25 (1,0 × 15 см), предварительно уравновешенную 10 мМ Tris-HCl буфером, pH 7,5. Белки элюировали, последовательно, используя 20 мМ Tris-HCl (pH 9,0); 20 мМ Tris-HCl (pH 8,5); 30 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 40 мМ Tris-HCl (pH 7,5); 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0); 75 мМ Tris-HCl (pH 6,5); 100 мМ Tris-HCl (pH 6,0); 0,5 M NaCl в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 1 M NaCl в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) при скорости потока 0,25 мл/мин. Мониторинг процесса элюции проводили под контролем поглощения при 280 нм. Полученные фракции анализировали на присутствие протеолитической активности, используя в качестве субстрата казеин и регистрируя поглощение при 660 нм.

Обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (RP-HPLC assay). После гель-фильтрации на колонке с DEAE-Sephadex A-25 очищенную протеазу подвергали RP-HPLC на колонке C_{18} (150 мм × 4,60 мм, размер частиц – 5 мкм), предварительно уравновешенной 0,1%-ной трифторуксусной кислотой (TFA) в воде с использованием прибора «Shimadzu LC-20AD prominence HPLC» с детектором PDA («Shimadzu Corp.», Япония). Связавшиеся белки элюировали линейным градиентом (0–100%) ацетонитрила, 0,1% TFA в течение 40 мин при скорости потока 1 мл/мин. Мониторинг элюции проводили при длине волны 280 нм.

Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Молекулярную массу цистеиновой протеазы (FSCP) определяли с помощью метода масс-спектрометрии с использованием прибора «Bruker Daltonics MALDI-TOF» («Bruker Daltonics», США) в режиме положительной ионизации. В качестве матрикса MALDI была использована α-циано-4-гидроксикоричная кислота.

Метод кругового дихроизма (КД). Спектры КД белка FSCP (20 мкг/мл в дважды дистиллированной воде Milli-Q) получали с использованием спектрополяриметра «JASCO J-815» («Bayer», Германия). Спектры регистрировали при комнатной температуре в диапазоне 190–250 нм с использованием кварцевой кюветы с длиной оптического пути 1 мм. Ширина полосы 1 нм, время ответа 1 с, скорость сканирования 100 нм/мин. Итоговый спектр является совокупностью трех сканов. Расчет вторичной структуры на основе полученных спектров КД производили с помощью программы «K2d».

Электрофорез белков в SDS-PAGE и окрашивание йодной кислотой и Шиффовым основанием (PAS staining). Электрофорез белков в 10%-ном SDS-PAGE осуществляли по методу Laemmli [15]. Разделение белков грубого экстракта семян льна (FSBE, 100 мкг белка) и анализ чистоты очищенного белка FSCP (50 мкг) проводили в восстанавливающих или в невосстанавливающих условиях в Tris-глициновом буфере, pH 8,3, содержащем 0,1% SDS, в течение 2 ч при комнатной температуре. После завершения электрофореза для выявления полос белка гели окрашивали 0,1%-ным красителем Coomassie brilliant blue R-250, и затем их обесцвечивали смесью этанол/уксусная кислота/вода (40/10/50, *v/v/v*). Для определения молекулярной массы были использованы стандарты со значениями молекулярной массы от 14,3 до 200 кДа.

Окрашивание гелей с использованием йодной кислоты и основания Шиффа (PAS staining) проводили по методу Leach [16]. После завершения электрофореза гель фиксировали в 7,5% уксусной кислоте и оставляли при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем гель промывали 1%-ной азотной кислотой и инкубировали в 0,2%-ном водном растворе йодной кислоты при 4 °C в течение 45 мин. После этого гель помещали в раствор реагента Шиффа на 24 ч при 4 °C. После завершения окрашивания гель обесцвечивали с использованием 10%-ной уксусной кислоты, чтобы выявить полосы белков, окрашенные в розовый цвет.

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность определяли, как было описано в работе Satake et al. [17]. 10 мкг белка FSCP инкубировали с 0,4 мл раствора свободного от липидов казеина (2% в 0,2 M Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме 1 мл в течение 2,5 ч при 37 °C. Непереваренный казеин осаждали

путём добавления 1,5 мл 0,44 М трихлоруксусной кислоты (TCA) и оставляли в течение 30 мин. Затем проводили центрифугирование образцов при 2000 g в течение 10 мин. К 1 мл супернатанта последовательно добавляли карбонат натрия (2,5 мл, 0,4 М) и реактив Folin–Ciocalteu (1/2). Поглощение окрашенных образцов определяли при 660 нм. За единицу активности фермента было принято количество фермента, необходимое для увеличения поглощения при 660 нм на величину, равную 0,01. Удельную активность фермента выражали в виде ед./мин на мг белка. При определении влияния различных ингибиторов белок FSCP (10 мкг) предварительно инкубировали в течение 30 мин с одним из ингибиторов (5 мм): EDTA; 1,10-фенантролин; PMSF или IAA. Во всех случаях были использованы соответствующие контроли.

Зимограмма. Зимограммы FSCP получали, как было описано ранее [18]. Вкратце, образцы FSCP (5 мкг и 10 мкг), приготовленные в невосстанавливающих условиях, наносили на разделяющий гель, содержащий 2%-ный казеин/желатин. После завершения электрофореза гели промывали 10 мМ натрий-фосфатным буфером (PBS), pH 7,0, содержащим 2,5% Triton X-100, при постоянном перемешивании в течение 1 ч, чтобы удалить SDS. Гель инкубировали в течение ночи при 37 °C в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,6, содержащем 50 мМ $CaCl_2$ и 40 мМ NaCl. Затем гель подвергали окрашиванию для выявления полупрозрачных полос, соответствующих активному ферменту.

Влияние pH, температуры и продолжительности реакции на активность FSCP. Чтобы определить оптимальное значение pH для FSCP, измеряли её активности в диапазоне значений pH 3–9. С этой целью 10 мкг фермента инкубировали с 0,4 мл раствора, не содержащего примеси жиров казеина (2% в 0,2 М Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме реакционной смеси 1 мл в течение 2,5 ч при 37 °C. Чтобы определить влияние температуры, 10 мкг белка инкубировали с 0,4 мл обезжиренного казеина (2% в 0,2 М Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме реакционной смеси 1 мл при различных температурах (5–50 °C). Изменения активности фермента с течением времени определяли в результате инкубации 10 мкг белка FSCP с 0,4 мл обезжиренного казеина (2% в 0,2М Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме 1 мл при 37 °C в течение различных интервалов времени (30–240 мин). Во всех экспериментах не переваренный казеин осаждали, добавляя 1,5 мл 0,44 М TCA и оставляя в течение 30 мин. Протеолитическую активность фермента определяли, как было описано выше.

Определение времени рекальцификации плазмы. Время рекальцификации плазмы проводили в соответствии с методом, описанным в работе Quick et al. [19]. Вкратце, FSCP (2–14 мкг) предварительно инкубировали с 0,2 мл человеческой плазмы цитратной крови в присутствии 20 мкл 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, в течение 1 мин при 37 °C. Затем в реакционную смесь добавляли 20 мкл 0,25 М раствора $CaCl_2$ и регистрировали время образования сгустка.

Время кровотечения. Время кровотечения определяли, как описано ранее [20]. Вкратце, FSCP (0–8 мкг) в 30 мкл PBS вводили внутривенно в хвостовую вену (n = 5). Спустя 10 мин мыши были анестезированы диэтиловым эфиром, и им делали острые надрезы на кончике хвостовой вены длиной 3 мм. Сразу после этого хвосты мышей погружали вертикально в PBS, который предварительно был нагрет до 37 °C. Время кровотечения фиксировалось с момента начала кровотечения до его полной остановки.

Определение значений APTT и PT. 100 мкл нормальной плазмы цитратной крови человека предварительно инкубировали с белком FSCP (0–10 мкг) в течение 1 мин. Для проведения теста на APTT добавляли 100 мкл реагента, активированного в течение 3 мин при 37 °C. Образование сгустков инициировали добавлением 100 мкл 0,02 М $CaCl_2$, и регистрировали время формирования сгустков. При проведении теста на PT образование сгустков запускали добавлением 200 мкл реагента для определения PT. Записывали время (в секундах), в течение которого образовывался видимый глазом сгусток. Соотношение APTT и международного нормализованного соотношения (INR – international normalized ratio) для PT в каждой точке рассчитывали, исходя из значений контрольной плазмы, инкубированной с буфером в течение одинакового периода времени.

Определение фибриногенолитической активности. Фибриногенолитическую активность определяли, как было описано ранее в работе Ouyang и Teng [21]. Белок FSCP (0–10 мкг) инкубировали с фибриногеном плазмы крови человека (50 мкг) в общем объёме реакционной смеси 40 мкл 10 мМ Tris-HCl буфера, pH 7,4, в течение 4 ч при 37 °C. Реакцию останавливали, добавляя 20 мкл денатурирующего буфера, содержащего 1 М мочевины, 4% SDS и 4% β-меркаптоэтанола. Затем проводили электрофорез образцов в 10%-ном SDS-PAGE. При проведении определения влияния ингибиторов FSCP (10 мкг) предварительно инкубировали в течение ~20 мин с 5 мМ какого-либо из следующих ингибиторов: PMSF, IAA, EDTA или 1,10-фенантролин.

Определение конечных продуктов деградации фибриногена с использованием HPLC. Фибриноген (50 мкг) обрабатывали тромбином человека (2,5 единиц) или очищенным FSCP (10 мкг) в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,8, и инкубировали при 37 °C в течение 4 ч. Затем 20 мкл реакционной смеси анализировали на колонке C_{18} с помощью хроматографической системы «Shimadzu LC-Prominence HPLC system («Shimadzu Corp.», Япония). Белковые фракции получали с помощью градиента ацетонитрила и 0,1% TFA в воде в течение 10 мин. Контроль элюции проводили при 280 нм.

Определение фибринолитической активности. Активность белка FSCP в отношении фибриновых сгустков определяли, как ранее было описано в работе Rajesh et al. [22]. Вкратце, 100 человеческой плазмы цитратной крови смешивали с 20 мкл 0,2 М раствора $CaCl_2$ и инкубировали в течение 2 ч при 37 °C. Полученный сгусток тщательно промывали 5–6 раз PBS и суспендировали в 400 мкл 0,2 М Tris-HCl (pH 8,5). Инициацию реакции осуществляли добавлением различных количеств белка FSCP (0–10 мкг) в 100 мкл PBS и инкубировали в течение 2,5 ч при 37 °C. Непереваренный сгусток осаждали, добавляя 750 мкл 0,44 М TCA в течение 30 мин, после чего образцы центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g. Аликвоты супернатанта объёмом 0,5 мл переносили в чистые стеклянные пробирки, добавляли по 1,25 мл 0,4 М карбоната натрия и по 0,25 мл разведенного в 2 раза фенол-содержащего реагента Folin–Ciocalteu и оставляли на 30 мин. Образовавшиеся окрашенные продукты реакции регистрировали при 660 нм. За единицу активности принимали количество фермента, которое необходимо для увеличения поглощения при 660 нм на 0,01.

Определение фибринолитической активности с помощью SDS-PAGE электрофореза. Получение фибриновых сгустков проводили, как описано выше. Полученные сгустки инкубировали с различными концентрациями белка FSCP (0–10 мкг) в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в конечном объёме реакционной смеси 40 мкл при 37 °C в течение 12 ч. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл денатурирующего буфера для образцов, содержащего 4% SDS, 1 М мочевины и 4% β-меркаптоэтанола. Образцы выдерживали в кипящей водяной бане в течение 10 мин и затем подвергали центрифугированию, чтобы осадить обрывки сгустков плазмы. Отбирали аликвоты супернатанта объёмом 30 мкл и анализировали с помощью гель-электрофореза в 7,5%-ном SDS-PAGE. При проведении анализа с использованием ингибиторов белок FSCP (10 мкг) предварительно инкубировали в течение ~15 мин с 5 мМ какого-либо из использованных в работе ингибиторов (PMSF, EDTA, IAA или 1,10-фенантролин).

Деградация белков плазмы крови. Определение уровня деградации белков плазмы крови проводили по методу, ранее описанному в работе Kumar et al. [23]. Белок FSCP (0–10 мкг) инкубировали с 100 мкг белков плазмы крови в течение 12 ч при 37 °C в общем реакционном объёме 40 мкл, в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), содержащем 10 мМ NaCl и 0,05% азида натрия. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл денатурирующего буфера, содержащего 4% SDS, и последующим кипячением образцов в течение 5 мин. Затем образцы анализировали с использованием метода электрофореза белков в 7,5%-ном SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях.

Получение отмытых тромбоцитов. Отмытые тромбоциты получали в соответствии с методом, описанным Born [24]. 1,5 мл буфера с лимонной кислотой и декстрозой добавляли в пластиковые центрифужные пробирки. Затем добавляли по 9 мл крови и центрифугировали в течение 15 мин при 30 g. Супернатант PRP переносили в пластиковые пробирки и выдерживали в инкубаторе при 37 °C в течение 15 мин и затем центрифугировали в течение 20 мин при 4500 g. Собирали осадок, и суспендировали его в буфере, содержащем раствор Тироде (Tyrode) и альбумин, pH 6,5. После перемешивания смесь центрифугировали при 4500 g в течение 20 мин. Осадок снова суспендировали в буфере, содержащем раствор Тироде (Tyrode) и альбумин, pH 6,5 и снова центрифугировали в течение 20 мин при 4500 g. Полученный осадок суспендировали в буфере, содержащем раствор Тироде (Tyrode) и альбумин, pH 7,35. Полученную суспензию использовали в дальнейшем для изучения агрегации тромбоцитов.

Определение степени агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов оценивали с помощью турбидиметрического метода, описанного Born [24], с использованием двухканального агрегометра «Chronolog whole blood/optical lumi aggregation system» («CHRONO-LOG CORP.», США). Аликвоты отмытых тромбоцитов предварительно инкубировали с различными концентрациями белка FSCP (0–6 мкг) в общем объёме реакционной смеси 0,25 мл. Процесс агрегации тромбоцитов запускали независимо друг от друга, добавляя тот или иной агонист из следующего списка: ADP, эпинефрин, арахидоновая кислота, тромбин, коллаген или PAF, и выдерживали в течение 6 мин. В случае индуцированной ADP и эпинефрином агрегации тромбоцитов до запуска процесса агрегации к отмытым тромбоцитам предварительно добавляли 50 мкг фибриногена.

Определение прямой гемолитической активности. Гемолитическую активность определяли, используя отмытые эритроциты человека. Вкратце, упакованные эритроциты человека суспендировали в PBS в соотношении 1/9 (*v*/*v*). 1 мл этой суспензии инкубировали независимо друг от друга с различными количествами белка FSCP (0–30 мкг) в течение 1 ч при 37 °C. Реакцию останавливали, добавляя 9 мл ледяного PBS, и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин при 37 °C. Количество гемоглобина в супернатанте измеряли при длине волны 540 нм. Гемолитическую активность выражали в виде процента лизированных клеток. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали лизис эритроцитов в дистиллированной воде (100%-ный лизис) и PBS соответственно.

Отек-индуцирующая активность. В данном случае был использован метод, описанный ранее Vishwanath et al. [25]. Группам мышей (n = 5 в каждой группе) независимо друг от друга в подушечки правой ноги вводили различные дозы белка FSCP (10–200 мкг) в 20 мкл физиологического раствора. В подушечки левой ноги вводили только 20 мкл физраствора, и это служило в качестве контроля. Спустя 1 ч мышей подвергали анестезии в результате ингаляции диэтилового эфира. Задние конечности на уровне голеностопного сустава удаляли, и их взвешивали. Увеличение веса удаленной конечности рассчитывали как коэффициент отека, который был равен весу отечной ноги × 100/вес нормальной ноги. В качестве минимальной дозы, способной вызвать появление отеков, было определено количество белка, необходимое для достижения значения коэффициента отека 120%.

Геморрагическая активность. Геморрагическую активность определяли по методу, описанному ранее Kondo et al. [26]. Различные количества белка FSCP (0–30 мкг) в 30 мкл физиологического раствора вводили мышам внутрикожно (n = 5 в каждой группе). Группа мышей, которая получала только физраствор, служила в качестве отрицательного контроля, а группа, получавшая яд из *Daboia russelli*, являлась положительным контролем. Спустя 3 ч мышей подвергали анестезии с помощью ингаляции диэтиловым эфиром. Спинной участок поверхности кожи тщательно удаляли и обследовали, проводя его сравнение с картиной геморрагии у контрольных мышей, которым вводили только физраствор. Измеряли диаметр геморрагического пятна на внутренней поверхности кожи. Минимальную дозу, приводящую к кровоизлиянию, определяли как количество белка, вызывающего образование геморрагического пятна диаметром 10 мм.

Статистическая обработка полученных результатов. Полученные результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD). Статистический анализ был проведен с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между группами считались статистически достоверными, если значение $p < 0{,}01$.

Таблица 1. Влияние различных ингибиторов на протеолитическую активность белка FSCP

Ингибитор (5 мМ)	Активность (%)
Нет ингибитора	100
PMSF	99
IAA	8
EDTA	99
1,10-фенантролин	98

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Очистка и определение свойств белка FSCP. Для того чтобы выделить цистеиновую протеазу из FSBE нами было использовано сочетание методов колоночной хроматографии на Sephadex G-100 и DEAE-Sephadex A-25. В результате фракционирования FSCP с помощью гельфильтрации были получены два основных пика (рис. 1, *a*), и только во фракциях пика II была выявлена казеин-гидролизующая активность, указывающая на протеолитическую активность. Для очистки протеазы пик II фракционировали методом ионообменной колоночной хроматографии на DEAE-Sephadex A-25. Было получено 7 пиков (рис. 1, *b*). Все пики были проверены на наличие протеолитической активности с использованием казеина и желатина в качестве субстратов. Только пик IV гидролизовал субстраты с удельной активностью 3,45 и 4,20 ед./мин белка соответственно. Протеолитическая активность пика IV была полностью отменена IAA (ингибитором цистеиновой протеазы), в то время как 1,10-фенантролин, PMSF и ЭДТА были неэффективны, что указывало на присутствие остатка цистеина в активном участке фермента (табл. 1). На этом основании данный фермент был определен нами как цистеиновая протеаза семян льна (FSCP – flax seed cysteine protease).

Белок FSCP является мономером, что было ранее подтверждено наличием только одной полосы с молекулярной массой ~160 кДа при его электрофорезе в SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 2, *a*). Однако точная молекулярная масса белка

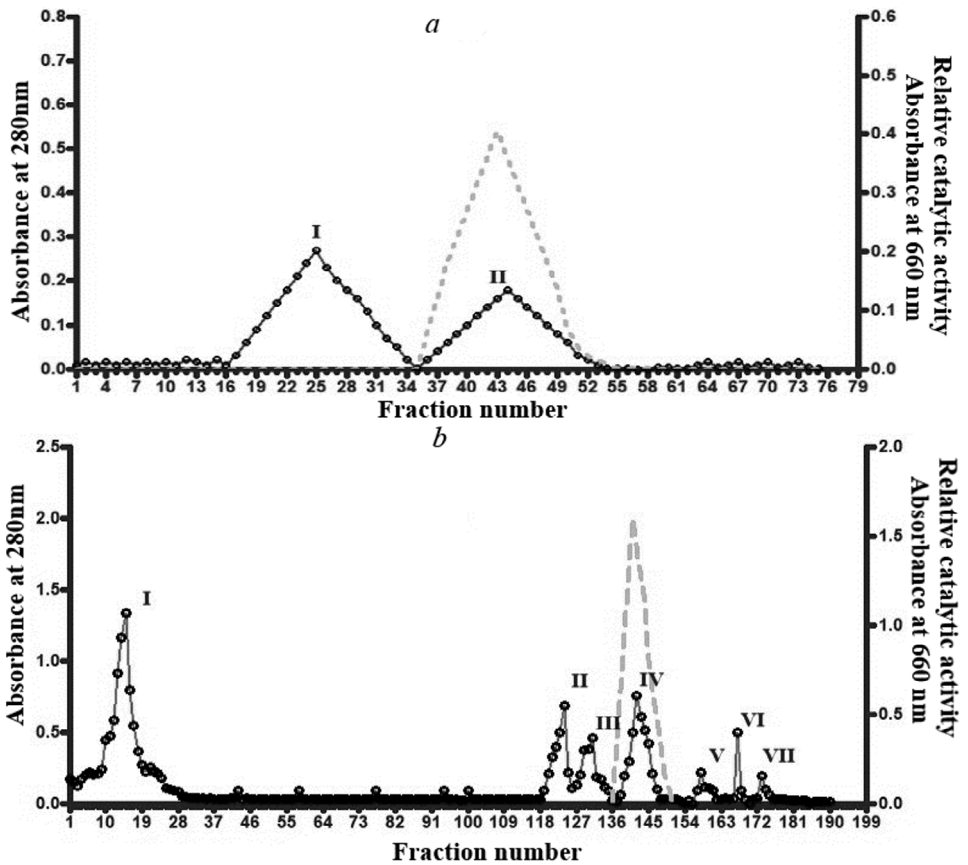


Рис. 1. *a* – Гель-фильтрация на колонке с Sephadex G-100. Препарат FSBE (100 мг в 1 мл 0,1M NaCl) наносили на колонку с Sephadex G-100 (1,5 × 108 см), предварительно уравновешенную 0,1 M NaCl. Белки элюировали 0,1 M NaCl при скорости потока 16 мл/ч. Контроль элюции проводили при 280 нм. Каждую вторую фракцию белка (1,6 мл) анализировали на протеолитическую активность, используя казеин в качестве субстрата (пунктиром показан профиль элюции фракций с протеолитической активностью). *b* – Хроматография на колонке с DEAE-Sephadex A-25. Фракции, соответствующие пику II (Peak-II), полученные на предыдущей стадии очистки белка (20 мг белка в 1 мл уравновешивающего буфера), наносили на колонку с DEAE-Sephadex A-25 (1,5 × 20 см), предварительно уравновешенную 10 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,0. Далее белки последовательно элюировали (см. раздел «Материалы и Методы») при скорости потока 15 мл/ч. Мониторинг процесса элюции проводили при 280 нм. В каждой второй пробирке определяли протеолитическую активность, используя в качестве субстрата казеин (пунктиром показан профиль элюции фракций с протеолитической активностью). (С цветными вариантами рис. 2–4, 6 и 8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

FSCP, определенная методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, составила 168 кДа (рис. 2, *c*). Белок FSCP, в отличие от фибриногена, не образовывал основания Шиффа при его обработке йодной кислотой. Это означает, что белок FSCP не содержит остатки углеводов (рис. 2, *b*). Чистота FSCP была подтверждена RP-HPLC, был выявлен единичный острый пик со временем удержания 7,2 мин (рис. 2, *d*).

Во вторичной структуре белка FSCP с помощью метода КД было выявлено ~25,6% спиральных структур, 25,8% поворотов и 48% структур типа «случайный клубок». При этом бета-складчатые структуры не были обнаружены (рис. 3, *a*). Белок FSCP был очищен в 19 раз (табл. 2). Гидролитическая активность белка FSCP в отношении казеина и желатина была подкреплена экспериментами по получению зимограмм. Белок FSCP показал сходную картину полупрозрачных полос активности в районе ~168 кДа в экспериментах по зимографии казеина и желатина соответственно (рис. 3, *b* и *e*). Было установлено, что оптимальными значениями pH и температуры для протеолитической активности FSCP являются pH 6,0 и 30 °C соответственно. Наибольшее количество гидролизованного субстрата наблюдается через 150 мин реакции (рис. 3, *f–h*).

FSCP демонстрирует выраженные антикоагулянтные свойства, вмешиваясь во внутренние пути каскада свертывания крови. Препарат FSCP (12 мкг) показал сильную антикоагулянтную активность, увеличивая время свертывания цитратной крови в препаратах PRP (от 222 до 1100 с)

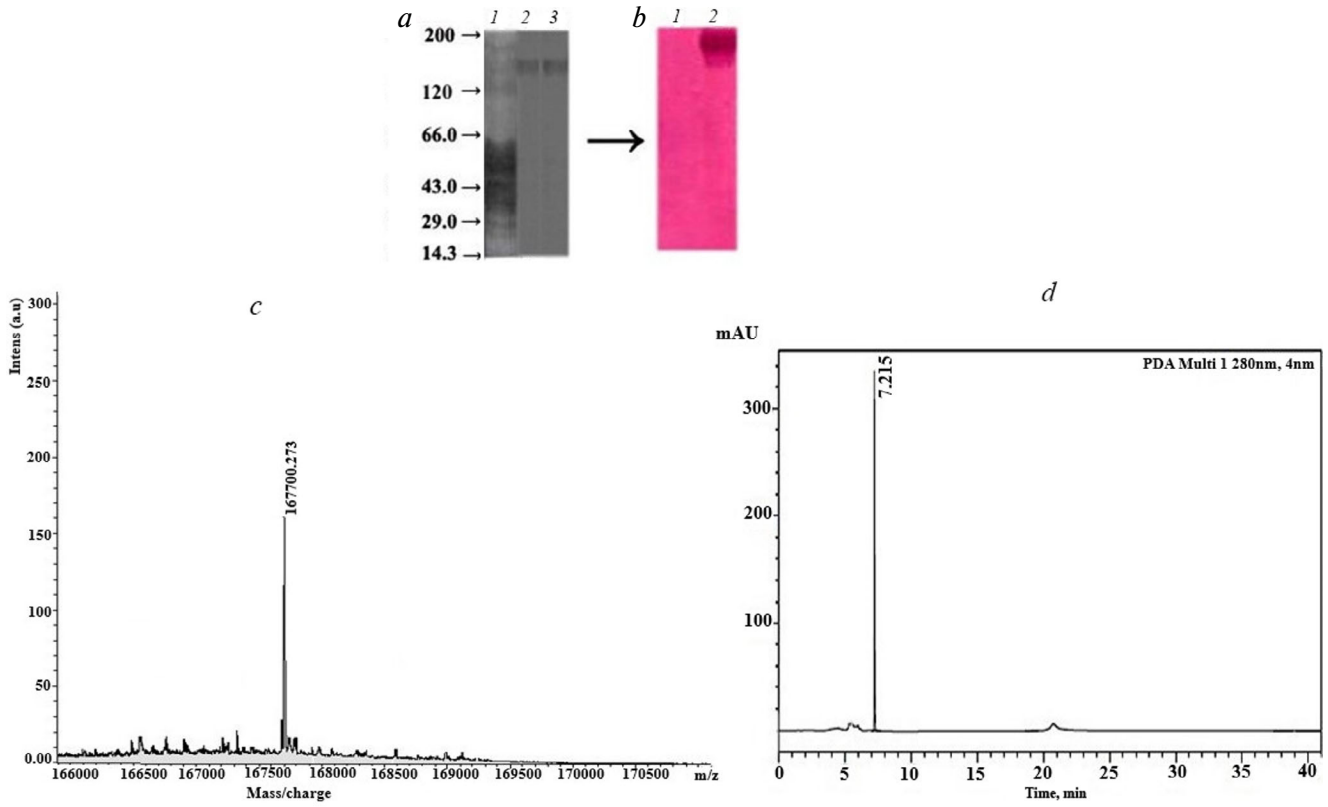


Рис. 2. *a* – Электрофорез белков в 10%-ном SDS-PAGE: *1* – экстракт семян льна (100 мкг), невосстанавливающие условия; *2* – белок FSCP (50 мкг) в невосстанавливающих условиях; *3* – FSCP (50 мкг) в восстанавливающих условиях. *b* – Окрашивание йодной кислотой и основанием FSCP (*1*), 50 мкг и фибриноген (*2*), 50 мкг, положительный контроль; *M* – маркеры молекулярной массы: H-цепь миозина (200 кДа), β-галактозидаза (120 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (29 кДа) и лизоцим (14.3 кДа). *c* – Масс-спектрометрия MALDI-TOF белка FSCP (5 мкг) в режиме положительной ионизации с использованием в качестве матрикса α-циано-4-гидроксикоричной кислоты. *d* – RP-HPLC белка FSCP (5 мкг) на колонке C_{18} предварительно уравновешенной 0,1% TFA в воде. Элюцию белка проводили с помощью увеличивающейся концентрации (0–100%, 40 мин) ацетонитрила, 0,1% TFA при скорости потока 1 мл/мин. Мониторинг элюции проводили при 280 нм

и PPP (от 256 до 1210 с) человека (рис. 4, *a*). Антикоагулянтная активность белка FSCP была подтверждена *in vivo* с помощью теста на кровотечение из хвостовой вены мыши. Внутривенная инъекция препарата FSCP приводила к значительному доза-зависимому увеличению продолжительности кровотечения. Продолжительность кровотечения превышала 800 с ($p < 0{,}01$) при инъекции 8 мкг в сравнении с 200 с при обработке контрольных мышей PBS (рис. 4, *c*). IAA полностью подавляла антикоагулянтную активность FSCP как *in vitro*, так и *in vivo*, однако другие ингибиторы протеаз на неё не влияли (рис. 4, *b* и *d*). Кроме того, FSCP пролонгировал процесс образования сгустков только в случае APTT, но не PT. Эти результаты позволяют предположить, что антикоагулянтное действие FSCP может быть связано с его вмешательством во внутренний путь каскада свертывания крови (табл. 3).

FSCP вызывает гидролиз только фибриногена и не действует на другие белки плазмы крови. FSCP в количестве 10 мкг полностью расщеплял Aα-цепь и частично Bβ-цепь фибриногена в доза-зависимой манере (рис. 5, *a*) при инкубации в течение 4 ч при 37 °C. С другой стороны, 5 мкг FSCP при инкубации в течение 24 ч при 37 °C не вызывали гидролиз γ-цепи фибриногена (рис. 5, *b*). Фибриногенолитическая активность FSCP отменялась полностью только при добавлении IAA. PMSF, EDTA и 1,10-фенантролин на неё не влияли (рис. 5, *c*). Субстратная специфичность FSCP оценивалась с использованием белков плазмы крови человека. FSCP специфически расщеплял фибриноген, не влияя на другие белки плазмы, при инкубации в течение 12 ч в максимальной дозе 10 мкг при 37 °C (в качестве положительного контроля использовался только фибриноген) (рис. 5, *d*).

FSCP растворяет сгустки фибрина. FSCP растворял фибриновый сгусток с удельной активностью 4,16 ед./мин на мг белка (рис. 6, *a*). Его способность гидролизовать фибрин была

Таблица 2. Сводная таблица результатов очистки белка FSCP. Приведены значения в виде среднего трех независимых определений

Метод	Общее количество белка (мг)	Выход белка (%)	Удельная активность (U/мин·мг белка)	Общая активность	Выход активности (%)	Степень очистки
Грубый буферный экстракт	100	100	0,18 ± 0,02	18	100	1,0
Sephadex G-100	20	20	0,81 ± 0,04	16	90	4,5
DEAE-Sephadex A-25	1	1	3,45 ± 0,03	3	19	19

подтверждена картиной разделения белковых полос в результате проведения SDS-PAGE при деградации фибрина. 10 мкг FSCP за 12 ч инкубации при 37 °C расщепляли только целый фибрин, а димер γ–γ, α-цепь и β-цепь оставались устойчивыми к протеолизу (рис. 6, *b*). Странно, но при инкубации в течение 24 ч при 37 °C FSCP в количестве 4 мкг расщеплял все цепи фибрина, и эффективность такого расщепления зависела от продолжительности инкубации (рис. 6, *c*). Его фибринолитическая активность полностью подавлялась IAA, но не PMSF, EDTA и 1,10-фенантролином (рис. 6, *d*).

FSCP расщепляет фибриноген с его *C*-конца. Чтобы определить сайты деградации фибриногена в результате действия FSCP, конечные продукты деградации фибриногена в результате его инкубации с тромбином и FSCP анализировали с помощью метода HPLC. Фибриноген элюировался с колонки в виде единственного пика с временем задержки 1,3 мин (рис. 7, *a*). Расщепление фибриногена тромбином дало пять пиков со временем удержания 1; 1,2; 1,4; 1,6 и 2 мин соответственно (рис. 7, *b*). В то же время фибриноген, обработанный FSCP, также показывал пять пиков элюции с временем задержки 1; 1,4; 1,6;

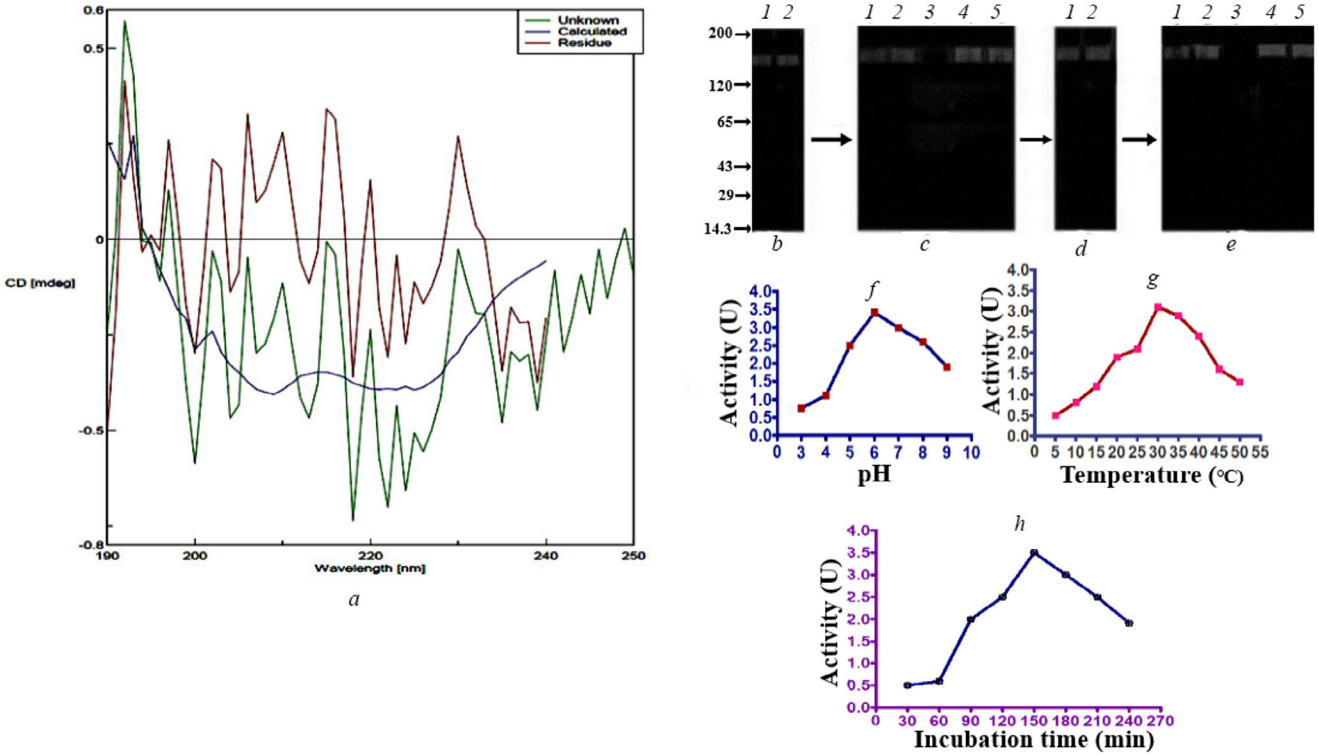


Рис. 3. *a* – Спектры кругового дихроизма белка FSCP (20 мкг в дважды дистиллированной воде). *b* – Зимограмма FSCP с казеином: 5 мкг (*1*) и 10 мкг (*2*) FSCP. *c* – Зимограмма FSCP (5 мкг) с казеином в отсутствие или в присутствии ингибиторов (5 мМ): нет ингибиторов (*1*); PMSF (*2*); IAA (*3*); 1,10-фенантролин (*4*); EDTA (*5*). *d* – Зимограмма FSCP с желатином: 5 мкг (*1*) и 10 мкг (*2*) белка FSCP. *e* – Зимограмма FSCP (5 мкг) с желатином в отсутствие или в присутствии ингибиторов (5 мМ): нет ингибиторов (*1*); PMSF (*2*); IAA (*3*); 1,10-фенантролин (*4*); EDTA (*5*). *f* – Влияние pH (3–9) на протеолитическую активность FSCP. *g* – Влияние температуры (5–50°C) на протеолитическую активность FSCP. *h* – Влияние продолжительности инкубации (30–240 мин) на протеолитическую активность FSCP

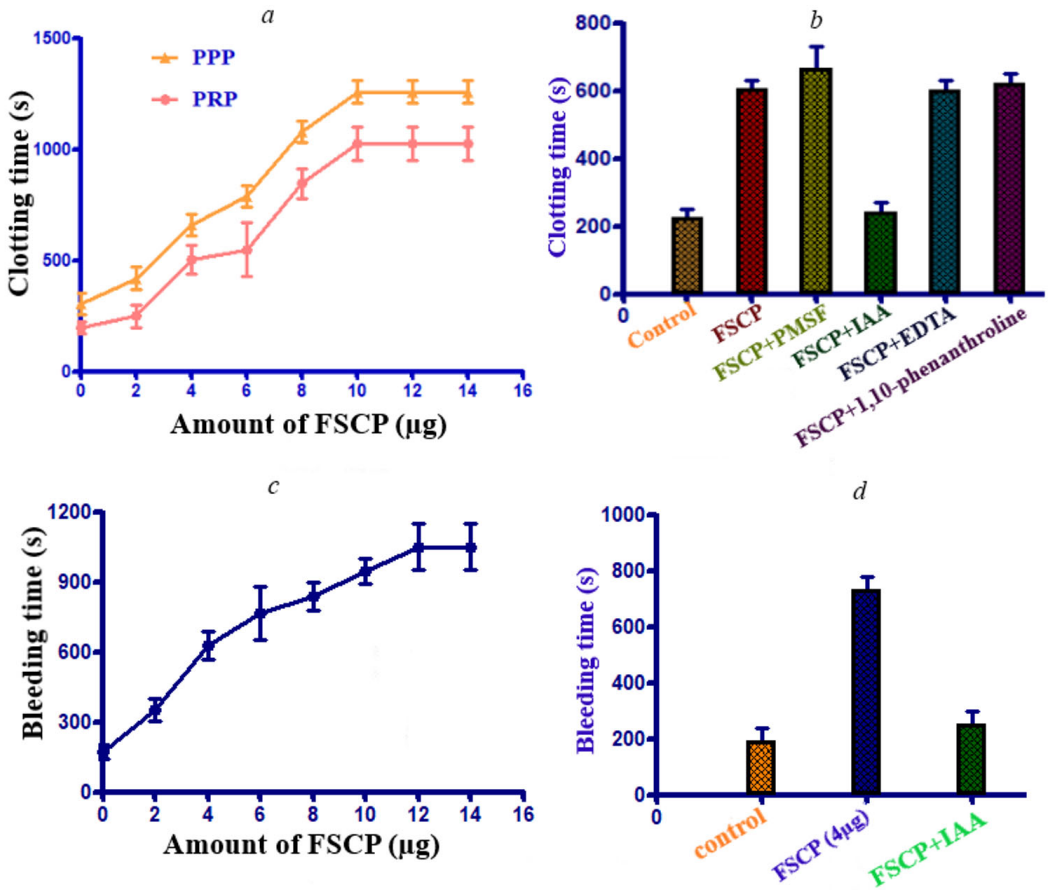


Рис. 4. *a* – Влияние FSCP на время рекальцификации плазмы. *b* – Влияние ингибиторов протеаз на антикоагулянтную активность FSCP. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с 5 мМ ингибитора (PMSF, IAA, EDTA, 1,10-фенантролина) в течение 15 мин при 37 °C. *c* – Влияние FSCP на продолжительность кровотечения из хвостовой вены после введения FSCP измеряли спустя 10 мин после внутривенного введения PBS или различных количеств белка FSCP. *d* – Влияние ингибиторов на продолжительность кровотечения из хвостовой вены. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с 5 мМ IAA в течение 15 мин при 37 °C. Каждое значение представляет среднее ± SD от трех независимых определений ($p < 0,01$)

1,8 и 2 мин соответственно (рис. 7, *c*). Однако хроматограммы, полученные в обоих случаях, отличались друг от друга. Было установлено, что FSCP расщеплял фибриноген с *C*-конца. На рис. 7, *d* и *e* представлена картина разделения белковых полос конечных продуктов деградации фибриногена, выявленная с помощью SDS-PAGE.

FSCP обладает антитромбоцитарной активностью. FSCP (6 мкг) ингибировал агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцированную различными агонистами, такими как ADP, эпинефрин, тромбин, коллаген, арахидоновая кислота и PAF. Процент ингибирования индуцированной вышеуказанными агонистами агрегации

Таблица 3. Доза-зависимое влияние FSCP на время свертывания человеческой плазмы в норме

FSCP, мкг	PT, с	PT (INR)	APTT, с	Коэффициент APTT
0	11 ± 0,01	0,89 ± 0,05	34 ± 0,02	1,31 ± 0,09
2	11 ± 0,05	0,98 ± 0,02	47 ± 0,07	2,03 ± 0,01
4	12 ± 0,02	1,15 ± 0,07	71 ± 0,05	3,99 ± 0,05
6	12 ± 0,08	1,08 ± 0,03	96 ± 0,01	5,40 ± 0,01
8	11 ± 0,03	0,91 ± 0,09	127 ± 0,09	7,54 ± 0,03
10	11 ± 0,1	1,03 ± 0,04	166 ± 0,03	9,11 ± 0,02

тромбоцитов при инкубации с FSCP был равен 62%, 73%, 57%, 88%, 70% и 60% соответственно (рис. 8, *a*). Сравнение изученных агонистов показало, что FSCP ингибировал агрегацию отмытых тромбоцитов в следующем порядке: коллаген > эпинефрин > арахидоновая кислота > ADP > фактор активации тромбоцитов > тромбин.

FSCP является нетоксичным белком. Было установлено, что FSCP не токсичен, так как он не повреждает мембраны эритроцитов. FSCP также не повреждал кровеносные сосуды, что позволяет предположить отсутствие у него геморрагической активности (рис. 8, *b*). В подушечках ног экспериментальных мышей не было выявлено накопления жидкости и поэтому можно считать, что белок FSCP не обладает способностью вызывать появление отеков (рис. 8, *c*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы очистили и охарактеризовали FSCP – фермент с сильными антикоагулянтными, антитромбоцитарными и фибринолитическими свойствами. FSCP был успешно очищен с использованием методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. FSCP является мономерным белком, поскольку он движется в виде одной полосы при SDS-PAGE как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях и элюируется в виде одного пика при RP-HPLC. Эти результаты также указывают на гомогенность и чистоту полученного нами препарата фермента. Точная молекулярная масса, определенная с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, составляет 168 кДа. Вторичная структура FSCP содержала спиральные структуры, повороты спирали и структуры типа «случайный клубок», но не имела бета-складчатых структур. FSCP расщеплял казеин и желатин с удельной активностью 3,45 и 4,20 ед./ мин на мг белка соответственно при 37 °C. Оптимальное значение pH для этого фермента оказалось равным 6,0. Оптимум температуры был определен как 30 °C, и наибольшая степень гидролиза субстратов наблюдалась че-

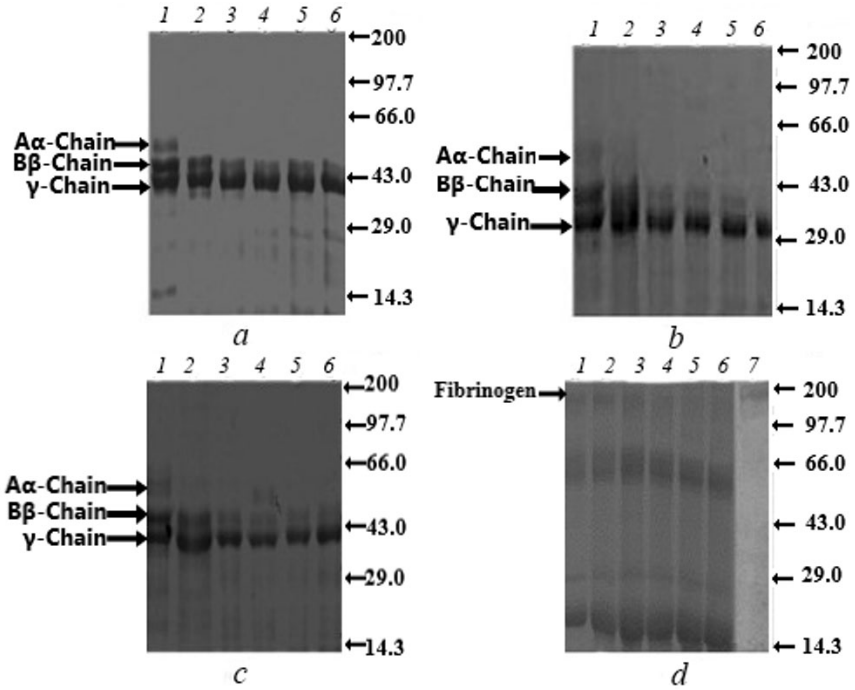


Рис. 5. *a* – Гидролиз фибриногена (50 мкг) в течение 4 ч при 37 °C в отсутствие фермента (*1*) и в присутствии 2 мкг (*2*), 4 мкг (*3*), 6 мкг (*4*), 8 мкг (*5*) и 10 мкг (*6*) белка FSCP. Продукты гидролиза после электрофореза в 10% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. *b* – Гидролиз фибриногена (50 мкг) белком FSCP (4 мкг) после инкубации в течение 0 ч (*1*), 4 ч (*2*), 8 ч (*3*), 12 ч (*4*), 16 ч (*5*) и 24 ч (*6*) при 37 °C. *c* – Влияние ингибиторов протеаз на фибриногенолитическую активность белка FSCP. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с ингибиторами протеаз (5 мМ) в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию начинали добавлением 50 мкг фибриногена и реакционную смесь инкубировали в течение 4 ч: *1* – только фибриноген, *2* – фибриноген в присутствии FSCP, *3* – FSCP и PMSF, *4* – FSCP и IAA, *5* – FSCP и EDTA и *6* – FSCP и 1,10-фенантролин. *M* – маркеры молекулярной массы, кДа. *d* – Деградация белков плазмы крови человека. Белки плазмы крови (100 мкг) инкубировали в отсутствие фермента (*1*) или в присутствии 2 мкг (*2*), 4 мкг (*3*), 6 мкг (*4*), 8 мкг (*5*) и 10 мкг (*6*) белка FSCP в 40 мкл 10 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,4) при 37 °C. Затем их анализировали с помощью 7,5% SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях. В качестве контроля использовали фибриноген (20 мкг)

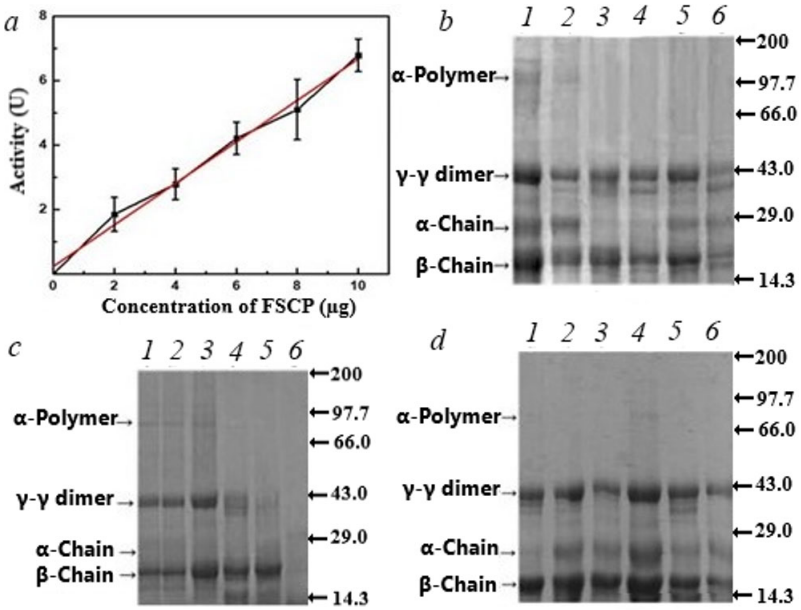


Рис. 6. Фибринолитическая активность FSCP. *a* – Колориметрическое определение фибринолитической активности. Отмытый сгусток крови инкубировали с 0–10 мкг белка FSCP в течение 2,5 ч и деградацию субстрата оценивали по поглощению при 660 нм. *b* – Влияние количества белка FSCP на гидролиз сгустков крови. Промытый сгусток плазмы крови инкубировали течение 12 ч: в отсутствие фермента (*1*), с 2 мкг (*2*), 4 мкг (*3*), 6 мкг (*4*), 8 мкг (*5*) и 10 мкг (*6*) FSCP. Продукты реакции анализировали с помощью метода SDS-PAGE (7,5%). *c* – Зависимость гидролиза сгустков крови от продолжительности инкубации. Фибриновый сгусток инкубировали при 37 °C в отсутствие фермента (*1*) или в присутствии белка FSCP (4 мкг) в течение 0 ч (*2*), 6 ч (*3*), 12 ч (*4*), 18 ч (*5*) и 24 ч (*6*). *d* – Ингибирование активности FSCP. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с ингибиторами протеаз (5 мМ) в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию запускали добавлением фибринового сгустка. Реакционную смесь инкубировали в течение 12 ч: фибриновый сгусток (*1*), фибриновый сгусток в присутствии FSCP (*2*), FSCP и PMSF (*3*), FSCP и IAA (*4*), FSCP и EDTA (*5*); FSCP и 1,10-фенантролин (*6*)

рез 150 мин реакции. В структуре белка FSCP отсутствуют углеводные остатки, так как этот белок не образовывал основания Шиффа. IAA ингибировала активность FSCP. В то же время он был малочувствителен к действию хелаторов металлов (EDTA и 1,10-фенантролин) и ингибитора сериновых протеаз (PMSF). Поэтому нами было предположено, что этот фермент принадлежит к цистеиновым протеазам. В семенах содержится удивительно большое количество протеолитических ферментов, включая сериновые, цистеиновые, аспартат-зависимые протеазы и металлопротеазы [27]. Были всесторонне изучены сериновые протеазы и металлопротеазы из латекса растений, клещей, дождевых червей, гусениц и различных ядов змей, пауков, пчел и семян растений [28–30]. В то время как цистеиновые протеазы из семян растений были охарактеризованы в наименьшей степени.

Гемостаз – это физиологическое явление, которое играет ключевую роль в остановке кровотечения, возникающего при повреждении кровеносных сосудов [31]. В его поддержании участвуют факторы коагуляции внутреннего пути (факторы IX–XII), факторы коагуляции внешнего пути (тканевой фактор и фактор VII) и факторы коагуляции общего пути (фактор X, протромбин, тромбин, фибриноген, фибриновый сгусток и фактор XIII). Активация вышеуказанных факторов имеет место при воздействии необычных поверхностей и/или повреждении тканей через активацию зимогенов [32]. Антикоагулянты обычно блокируют специфические факторы внутренних, внешних и/или общих путей свертывания крови. FSCP показал сильную антикоагулянтную активность как *in vitro*, так и *in vivo*. Тест APTT оценивает активность внутренних факторов пути в образовании сгустка, в то время как тест PT оценивает инициацию образования сгустка через внешний путь [33]. Тот факт, что FSCP увеличивал время образования сгустка только в тесте APTT, но не в тесте PT, предполагает вмешательство этого фермента во внутренний путь свертывания крови. Однако точное место действия FSCP на внутреннем пути остается неясным. Антикоагулянтное действие белка FSCP *in vitro* и *in vivo* полностью отменялось йодоуксусной кислотой, что указывает на ключевую роль остатков цистеина. Протеазы, которые принимают участие в каскаде свертывания крови, запуская про- или антикоагулянтную активность, были обнаружены у змей, пауков и в латексе растений [34–36]. Протеазы из змеиного яда (Ancrod) и грибов

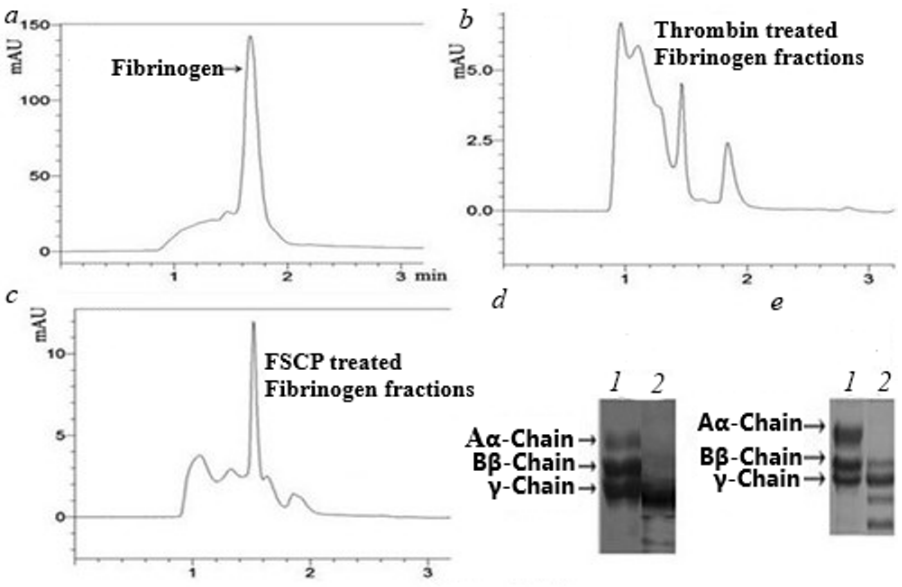


Рис. 7. Результат HPLC 50 мкг фибриногена (*a*) и продуктов его деградации, вызванной тромбином человека (*b*) и FSCP (*c*). *d*, *e* – SDS-PAGE (10%) продуктов деградации фибриногена тромбином (*d*) и конечные продукты деградации белком FSCP (*e*)

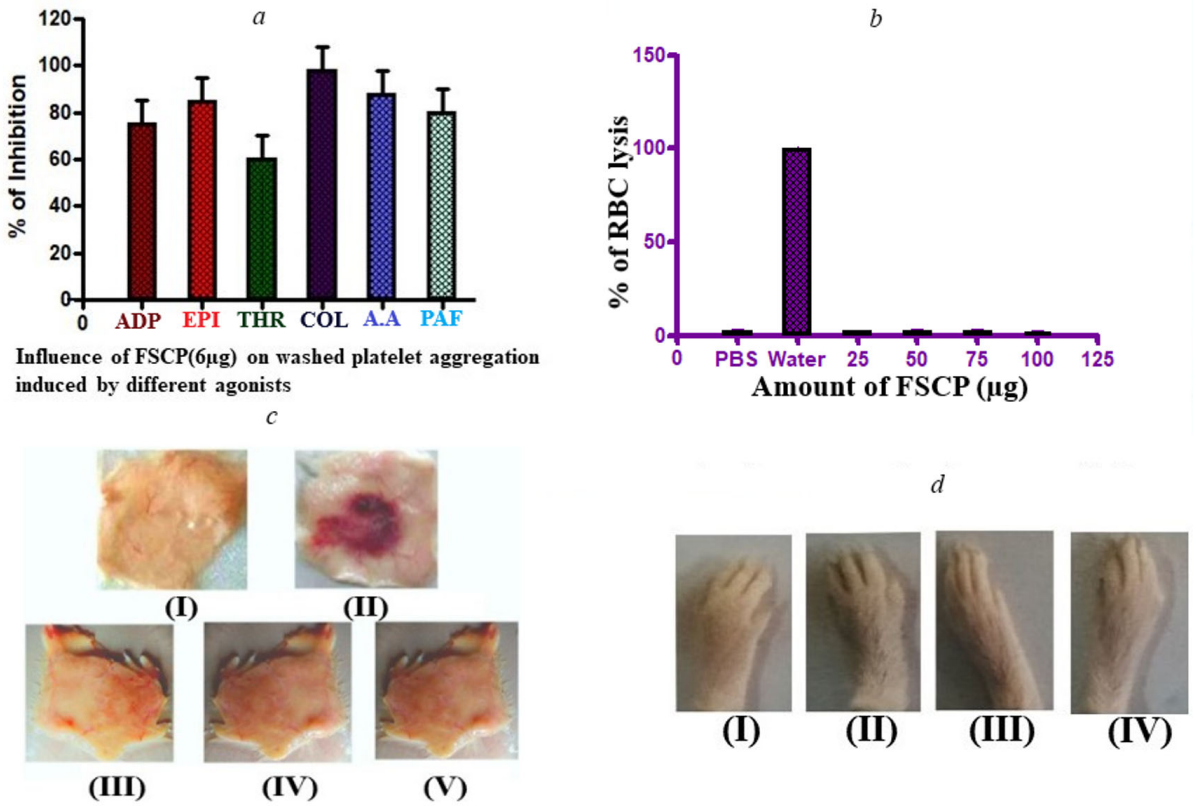


Рис. 8. *a* – Влияние FSCP (6 мкг) на агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцированную аденозиндифосфатом (10 мкМ ADP + 50 мкг фибриногена), эпинефрином (5 мкМ эпинефрина + 50 мкг фибриногена), тромбином (2 мкМ), коллагеном (5 мкг), арахидоновой кислотой (50 мкМ) и PAF (2 мкМ). *b* – Влияние FSCP на гемолитическую активность: FSCP (0–100 мкг) предварительно инкубировали в течение 30 мин с обработанными физраствором упакованными эритроцитами. Процент эритроцитов, подвергшихся лизису, рассчитывали по измерению свободного гемоглобина в супернатанте при 540 нм. *c* – Геморрагическая активность FSCP : I – физраствор, II – положительный контроль, яд из *Daboia russelli*, III – 25 мкг, IV – 50 мкг и V – 100 мкг белка FSCP в общем объеме 50 мкл вводили мышам. *d* – Влияние FSCP на индукцию отеков: положительный контроль, яд из MDH (I); физраствор (II); FSCP, 50 мкг (III) и 100 мкг (IV)

Aspergillus oryzae (Brinase) были использованы для лечения тромботических заболеваний [37, 38]. Было показано, что протеазы, которые участвуют в каскаде свертывания крови, могут расщеплять фибриноген и фибрин человека [39]. FSCP расщеплял Aα- и Bβ-цепи и частично γ-цепь фибриногена человека. Ферменты, подобные тромбину, расщепляют фибриноген с его *N*-конца с образованием так называемых фибринопептидов А и Б, способствуя свертыванию крови [40]. Расщепление фибриногена с *C*-конца вызывает образование укороченных фрагментов, отличающихся от этих фибринопептидов, приводит к задержке коагуляции [41]. Поэтому чтобы определить место действия белка FSCP на фибриноген, нами было проведено сравнение конечных продуктов деградации фибриногена с помощью тромбина и FSCP. Интересно, что при этом не было выявлено соответствия между конечными продуктами деградации, вызванными действием тромбина и FSCP. Поэтому можно предположить, что запускаемая белком FSCP антикоагуляция может быть следствием деградации фибриногена с его *C*-конца. Фибриногенолитическая активность FSCP полностью ингибировалась только IAA, но не ингибиторами сериновых протеаз и металлопротеаз, что указывает на роль остатка цистеина в активном центре этого фермента. Цистеиновые протеазы ранее были получены из латекса *Asclepias curassavica* L., растения семейства молочного дерева (*Asclepiadaceae*) [41]. Протеаза Pergularain E I, выделенная из латекса *Pergularia extensa*, расщепляла цепи фибриногена с его *N*-конца и была похожа по своим свойствам на тромбин [10]. Полученная нами FSCP продемонстрировала фибринолитическую активность и расщепляла все цепи фибрина. Образование сгустков и их последующее растворение играют основную роль не только при заживлении ран, но и при нормальном токе крови в артериях и венах [42–43]. Нарушение растворения сгустков также является основным фактором, вносящим вклад в патофизиологию тромбоза [44]. Так, устойчивый к нагреванию низкомолекулярный гликопротеин латекса из *Synadenium grantii* показывал фибринолитическую активность [45]. Кроме фибриногена, FSCP не расщеплял белки плазмы крови. Более того, FSCP ингибировала процесс агрегации отмытых тромбоцитов, индуцированный различными агонистами, такими как ADP, эпинефрин, тромбин, коллаген, арахидоновая кислота и PAF. Из всех изученных в настоящей работе агонистов белок FSCP более всего ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном, и в наименьшей мере он ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную PAF. Это может быть обусловлено специфичностью взаимодействия FSCP с рецепторами тромбоцитов или с другими агонистами. FSCP может распознавать в качестве субстратов рецепторы тромбоцитов и расщеплять их, вызывая таким образом их инактивацию, что, в свою очередь, может влиять на связывание агонистов с этими рецепторами. Другое предположение заключается в том, что отдельные агонисты могут взаимодействовать с различными доменами FSCP и регулировать (понижать) его способность ингибировать агрегацию тромбоцитов. Поэтому наблюдается снижение степени ингибирования агрегации тромбоцитов. Тем не менее в настоящее время преждевременно говорить о точном механизме действия FSCP на каскад свертывания крови и функционирование тромбоцитов, опираясь на результаты изучения их взаимодействия. Ранее были охарактеризованы различные антитромбоцитарные агенты из природных источников [46–48], включая покрытые лигнином наночастицы [49], локснекрогин из яда коричневого паука *Loxosceles gauchor* [50] и сериновая протеаза из яда паука *Hippasa agelenoides* [34]. FSCP оказался неспособен нарушать целостность мембран эритроцитов, и поэтому он не вызывал высвобождение гемоглобина из эритроцитов. Кроме того, он не повреждал кровеносные сосуды и не демонстрировал геморрагическую активность. Также FSCP не вызывает появление отеков на подушечках ног экспериментальных мышей, что указывает на отсутствие у него токсичности.

В целом, в настоящей работе из буферного экстракта семян льна был выделен высокомолекулярный (168 кДа) белок FSCP. Нами были продемонстрированы сильные антикоагулянтные и антитромбоцитарные свойства этого белка. Наблюдаемая антикоагулянтная активность FSCP может быть связана с его участием во внутреннем пути свертывания крови. FSCP также специфически расщеплял фибриноген и фибрин. Следовательно, большой интерес представляет изучение в дальнейшем механизма действия FSCP на каскад свертывания крови и функционирование тромбоцитов.

Благодарности. D.S. и S.K. выражают благодарность департаменту науки и технологий, правительству Индии, Нью-Дели и группе поддержки развития науки и технологий при правительстве штата Карнатака, Бангалор, за оказанную финансовую поддержку.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты проводились в соответствии с руководствами по этике и были одобрены институциональным комитетом по этике работы с человеком (IHEC-UOM No. 47Res/2014–15), университет штата Майсур, Майсуру, Индия. Проведение экспериментов над лабораторными животными было разрешено институциональным комитетом по этике работы с лабораторными животными (UOM/IAEC/02/2016), университет штата Майсур, Майсуру, Индия. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с руководством комитета по контролю и надзору за экспериментами над животными (CPCSEA – Committee for the purpose of monitoring and supervision of experiments on animals).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tarpila, A., Wennberg, T., and Tarpila, S. (2005) Flaxseed as a functional food, *Curr. Top. Nutr. Res.*, **3**, 167-188.
2. Yadav, R. P., Patel, A. K., and Jagannadham, M. V. (2011) Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin like serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn, *Process Biochem.*, **46**, 1654-1662.
3. Mahajan, R. T., and Chaudhary, G. M. (2014) Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation, *Int. J. Adv. Res.*, **2**, 1173-1181.
4. Fox, J. W., and Serrano, S. M. (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases, *Toxicon*, **45**, 969-985.
5. Koh, D. C., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 3030-3041.
6. Larréché, S., Mion, G., and Goyffon, M. (2008) Haemostasis disorders caused by snake venoms, *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, **27**, 302-309.
7. Zhu, Z. G., and Wu, S. G. (1999) Fibrinogenolytic properties of natrahagin (a proteinase from cobra venom) and its effect on human platelet aggregation, *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **20**, 944-947.
8. Kini, R. M., and Evans, H. J. (1991) Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from Naja nigricollis venom is independent of fibrinogen degradation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1095**, 117-121.
9. Guo, X. X., Zeng, L., and Lee, W. H. (2007) Isolation and cloning of a metalloproteinase from king cobra snake venom, *Toxicon*, **49**, 954-965.
10. Holenarasipur, S. V., Rajesh, R., Brigitte, F., Felix, F., and Bannikuppe, V. S. (2010) "Pergularain E I" – a plant cysteine protease with thrombin-like activity from Pergularia extensa latex, *Thromb. Res.*, **125**, e100-e105.
11. Gunter, R., Hans, P. S., and Friedrich, D. P. (2002) Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from Ficus carica, *Br. J. Haematol.*, **119**, 1042-1051.
12. Eagle, H., and Harris, T. N. (1937) Studies in blood coagulation: The coagulation of blood by proteolytic enzymes (trypsin, papain), *J. Gen. Physiol.*, **20**, 543-560.
13. Nandish, M. S. K., Kengaiah, J., Ramachandraiah, C., Shivaiah, A., Chandramma, S., and Girish, K. S. (2018) Anticoagulant, antiplatelet and fibrin clot hydrolyzing activities of flax seed buffer extract, *Pharmacogn. Mag.*, **14**, 175-183.
14. Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.
15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
16. Leach, B. S., Collawn, J. F., and Fish, W. W. (1980) Behavior of glycol-polypeptides with empirical molecular weight estimation methods in sodium dodecyl sulphate, *Biochemistry*, **9**, 5734-5741, doi: 10.1021/bi00566a011.
17. Satake, M., Murata, Y., and Suzuki, Y. (1963) Studies on snake venoms XIII Chromatographic separation and properties of three proteinases from Agkistrodon halys blomhoffii venom, *J. Biochem.*, **53**, 483-497, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127720.
18. Sowmyashree, G., Bhagyalakshmi, M., Girish, K. S., Kemparaju, K., Rangaiah, S. M., and Jane, H. P. (2015) Jackfruit (Artocarpush eterophyllus) seed extract exhibits fibrino(geno)lytic activity, *Pharmacogn. J.*, **7**, 171-177.
19. Quick, A. J., Stanley, M., and Bancroft, F. W. (1935) A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice, *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501-511.
20. Bhagyalakshmi, M., Sowmyashree, G., Kesturu, G. S., Kempaiah, K., and Sathish, J. G. (2015) Momordica charantia seed extract exhibits strong anticoagulant effect by specifically interfering in intrinsic pathway of blood coagulation and dissolves fibrin clot, *Blood Coagul. Fibrin.*, **26**, 191-199.
21. Ouyang, C., and Teng, C. M. (1976) Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus mucrosquamatus venom, *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 298-308.
22. Rajesh, R., Raghavendra, C. D., and Nataraju, A. (2005) Procoagulant activity of Calotropisgigantea latex associated with fibrin(ogen)olytic activity, *Toxicon*, **46**, 84-92.
23. Kumar, M. S., Devaraj, V. R., Vishwanath, V. S., and Kemparaju, K. (2010) Anti-coagulant activity of a metalloprotease: further characterization from the Indian cobra (Najanaja) venom, *J. Thromb. Thrombolysis*, **29**, 340-348.
24. Born, G. V. (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature*, **194**, 27-29.
25. Vishwanath, B. S., Kini, R. M., and Gowda, T. V. (1987) Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzyme from habu (Trimeresurus flavoviridis) venom and their interaction with the alkaloid arisatolochic acid, *Toxicon*, **25**, 501-515.
26. Kondo, H., Kondo, S., Itezawa, H., Murata, R., and Ohasaka, A. (1969) A study on the quantitative method from determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **13**, 43-51.
27. Ramachandraiah, C., Nandish, S. K. M., Kengaiah, J., Shivaiah, A., and Chandramma, S. (2017) Evaluation of anticoagulant and antiplatelet activity of Pisum sativum Pod extract, *J. Blood Res. Hematol. Dis.*, **2**.
28. Lynn, K. R., and Clevette, N. A. (1985) Two proteases from the latex of Euphorbia drupifera, *Phytochemistry*, **24**, 2843-2845.
29. Yadav, S. C., Pande, M., and Jagannadham, M. V. (2006) Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant Euphorbia milli, *Phytochemistry*, **67**, 1414-1426.
30. Devaraja, S., Nagaraju, S., Mahadeshwara, S. Y. H., Girish, K. S., and Kemparaju, K. (2008) A low molecular weight serine protease: purification and characterization from Hippasa agelenoides (Funnel web) spider venom gland extract, *Toxicon*, **52**, 130-138.
31. Reis, C. V., Portaro, F. C. V., Andrade, A. S., Fritzen, M., Fernandes, B. L., and Sampaio, C. A. M. (2006) A prothrombin activator serine protease from the Lonomia obiqua Caterpillar venom (Lopap): biochemical characterization, *Thromb. Res.*, **102**, 427-436.
32. Kumar, R. V., Gowda, C. D., Shivaprasad, H. V., Siddesha, J. M., Sharath, B. K., and Vishwanath, B. S. (2010) Purification and characterization of "Trimarin" a hemorrhagic metalloprotease with factor Xa-like Activity, from Trimeresurus malabaricus snake venom, *Thromb. Res.*, **126**, e356-e364.

33. Gowda, C. D., Shivaprasad, H. V., Kumar, R. V., Rajesh, R., Saikumari, Y. K., and Frey, B. M. (2011) Characteriz-ation of major zinc containing myonecrotic and Procoagulant metalloprotease "malabarin" from non-lethal trimeresurus malabaricus snake venom with thrombin like activity: its neutralization by chelating agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**, 2578-2588.
34. Devaraja, S., Girish, K. S., Gowtham, Y. J. M., and Kemparaju, K. (2010) The Hag-protease-II is a fibrin(ogen)ase from *Hippasa agelenoides* spider venom gland extract: purification, characterization and its role in hemostasis, *Toxicon.*, **57**, 248-258.
35. Shivaprasad, H. V., Rajesh, R., Nanda, B. L., Dharmappa, K. K., and Vishwanath, B. S. (2009) Thrombin like activity of Asclepias curassavica L. latex: action of cysteine proteases, *J. Ethno Pharmacol.*, **123**, 106-109.
36. Asadi, H., Yan, B., Dowling, R., Wong, S., and Mitchell, P. (2014) Advances in medical revascularisation treatment in acute ischemic stroke, *Trombosis*, **7**, 42-48.
37. Larsson, L. J., Frisch, E. P., Törneke, K., Lindblom, T., and Björk, I. (1988) Properties of the complex between alpha 2-macroglobulin and brinase, a proteinase from Aspergillus oryzae with thrombolytic effect, *Thromb. Res.*, **49**, 55-68.
38. Drake, T. A., Morrissey, J. H., and Edgington, T. S. (1989) Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis, *Am. J. Pathol.*, **134**, 1087-1097.
39. Åstrup, T. (1958) The haemostatic balance, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **2**, 347-357.
40. Lu, Q. (2005) Snake venoms and haemostasis, *J. Thromb. Hemostat.*, **3**, 1791-1799.
41. Shivaprasad, H. V., Riyaz, M., Venkatesh, K. R., Dharmappa, K. K., Tarannum, S., and Siddesha, J. M. (2009) Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities, *J. Thromb. Thrombolysis*, **28**, 304-308.
42. Veiga, S. S., da-Sliveria, R. R., Dreyfuss, J. L., Haoach, J., Pereira, A. M., and Mangili, O. C. (2000) Identification of high molecular weight serine proteases in Loxosceles intermedia (Brown spider) venom, *Toxicon*, **38**, 825-839.
43. Schwartz, M. L., Pizzo, S. V., Hill, R. L., and McKee, P. A. (1973) Human factor XIII from plasma and platelets: molecular weights, subunit structures, proteolytic activation and cross-linking of fibrinogen and fibrin, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1395-1407.
44. Lewis, S. D., Janus, T. J., Lorand, L., and Shafer, J. A. (1985) Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates, *Biochemistry*, **24**, 6772-6777.
45. Rajesh, R., Nataraju, A., Raghavendra, C. D., Frey, B. M., Frey, F. J., and Vishwanath, B. S. (2006) Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from Synadenium grantii latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, *Biochimie*, **88**, 1313-1322.
46. Kahn, M. L. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation, *Nature*, **394**, 690-694.
47. Sims, P. J., Wiedmer, T., Esmon, C. T., Weiss, H. J., and Shattil, S. J. (1989) Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **264**, 17049-17057.
48. Giesen, P. L. (1999) Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 2311-2315.
49. Marulasiddeshwara, M. B., Dakshayani, S. S., Sharath, K. M. N., Chethana, R., Raghavendra, K. P., and Devaraja, S. (2017) Facile-one pot-green synthesis, antibacterial, antifungal, antioxidant and antiplatelet activities of lignin capped silver nanoparticles: a promising therapeutic agent, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **81**, 182-190, doi: 10.1016/j.msec.2017.07.054.
50. Cunha, R. B., Barbaro, K. C., Muramatsu, D., Portaro, F. C. V., Fontes, W., and de-Souza, M. V. (2003) Purification and characterization of Loxnecrogin a dermonecrotic toxin from Loxosceles gaucho Brown spider venom, *J. Protein Chem.*, **22**, 135-146.

FLAXSEED CYSTEINE PROTEASE EXHIBITS STRONG ANTICOAGULANT, ANTIPLATELET, AND CLOT-DISSOLVING PROPERTIES

S. K. M. Nandish[1], J. Kengaiah[1], Ch. Ramachandraiah[1], Chandramma[1], A. Shivaiah[1], S. M. Santhosh[2], Thirunavukkarasu[3], and D. Sannaningaiah[1a]*

[1] *Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com*

[2] *Department of Medicinal Biochemistry and Microbiology (IMBM), Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden*

[3] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Pondicherry University, 605014 Pondicherry, Tamil Nadu, India*

Received March 21, 2020
Revised May 26, 2020
Accepted May 29, 2020

In this study, we purified and characterized flaxseed cysteine protease (FSCP) with strong anticoagulant, antiplatelet, and clot-dissolving properties. The enzyme was purified to homogeneity by a combination of gel permeation and ion-exchange column chromatography techniques. The purity of the enzyme was evaluated by SDS-PAGE, RP-HPLC, and MALDI-TOF. FSCP was observed a single band of approximately 160 kDa in SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The exact molecular mass of FSCP was found to be 168 kDa by MALDI-TOF. The CD spectra of FSCP revealed the presence of 25.6% helices, 25.8% turns, and 48% random coils with no beta-sheet structures. FSCP hydrolyzed both casein and gelatin with a specific activity of 3.5 and 4.2 unit/mg min respectively. The protef olytic activity of FSCP was completely abolished by iodoacetic acid (IAA), suggesting FSCP is a cysteine protease. The pH optimum for the proteolytic activity of FSCP was pH 6.0; the temperature optimum was 30°C. FSCP exhibited strong anticoagulant effect in both platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) by extending the clotting time from 222 to 1100 s and from 256 to 1210 s, respectively. FSCP degraded human fibrinogen and fibrin clots. The products of fibrinogen degradation by thrombin and FSCP were different. Furthermore, FSCP inhibited aggregation of washed platelets triggered by ADP, epinephrine, thrombin, collagen, arachidonic acid, and platelet activating factor (PAF). FSCP was found to be nontoxic as it did not damage the membrane of red blood cells (RBCs) and did not induce hemorrhage and edema in experimental mice.

Keywords: cysteine protease, anticoagulant, antiplatelet, non-toxic