Том 87, № 2, 2022

Специальный выпуск Неправильный фолдинг и агрегация белков при катаракте Редакторы выпуска R. Yousefi и Б.И. Курганов

Кристаллины как важные патогенные мишени при накоплении структурных повреждений, приводящих к агрегации белков и развитию катаракты <i>R. Yousefi</i>	155
Связь между структурой и шаперонной активностью αА-кристаллина человека после его модификации ассоциированными с сахарным диабетом окислительными агентами	
и защитная роль антиоксидантных молекул S.S. Moghadam, M. Ghahramani, K. Khoshaman, A. Oryan, A.A. Moosavi-Movahedi, <u>B.I. Kurganov</u> , and R. Yousefi	160
Биохимия хрусталика глаза: норма и катарактогенез (обзор) К.О. Муранов, М.А. Островский	177
Влияние трегалозы на олигомерное состояние и антиагрегационную активность αВ-кристаллина <i>Н.А. Чеботарева, Т.Б. Еронина, В.В. Михайлова, С.Г. Роман, К.В. Тугаева, Б.И. Курганов</i>	194
РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ	

Потенциальное влияние посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые на трансформацию амилоидогенных белков (мини-обзор)	
В.И. Муронец, Д.В. Поздышев, М.В. Медведева, И.А. Севостьянова	205
Механизм запасания и трансформации энергии в митохондриях на межфазной границе	
вода-мембрана (обзор)	
С.В. Нестеров, Е.Г. Смирнова, Л.С. Ягужинский	216
Исследования молекулярной регуляции процессов развития низших многоклеточных	
на примере стрекающих с использованием технологий высокопроизводительного	
секвенирования (оозор)	220
Т.В. Ерофеева, А.П. Григоренко, Ф.Е. Гусев, И.А. Косевич, Е.И. Рогаев	230
Геномика древних патогенов: первые успехи и перспективы (обзор)	
А.Б. Малярчук, Т.В. Андреева, И.Л. Кузнецова, С.С. Кунижева, М.С. Протасова,	
Л.И. Уральский, Т.В. Тяжелова, Ф.Е. Гусев, А.Д. Манахов, Е.И. Рогаев	258
Экспрессия генов опсинов в сетчатке глаза самок и самцов трёхиглой колюшки	
Gasterosteus aculeatus I. : зависимость от пресноволной алаптации и продактина	
Н.С. Павлова, А.Р. Гизатулина, Т.В. Неретина, О.В. Смирнова	278
В фокусе молекулярные функции антивозрастной деацетилазы SIRT3	
J. Nahálková	289

CONTENTS

Vol. 87, Issue 2, 2022

=

Special Issue	
Protein Misfolding and Aggregation in Cataract Disorders	
Guest Editors R. Yousefi and Boris I. Kurganov	
Crystallins as Important Pathogenic Targets for Accumulation of Structural Damages Resulting in Protein Aggregation and Cataract Development <i>R. Yousefi</i>	155
Relationship between the Structure and Chaperone Activity of Human αA-Crystallin after Its Modification with Diabetes-Associated Oxidative Agents and Protective Role of Antioxidant Compounds	
S. S. Moghadam, M. Ghahramani, K. Khoshaman, A. Oryan, A. A. Moosavi-Movahedi, <u>B.I. Kurganov</u> , and R. Yousefi	160
Biochemistry of Lens: Norm and Cataractogenesis (Review) K. O. Muranov and M. A. Ostrovsky	177
Effect of Trehalose on Oligomeric State and Anti-Aggregation Activity of αB-Crystallin N. A. Chebotareva, T. B. Eronina, V. V. Mikhaylova, S. G. Roman, K. V. Tugaeva, and B. I. Kurganov	194
REGULAR ARTICLES	
Post-Transcriptional Tyrosine Substitutions for Cysteine in Amyloidogenic Proteins (Mini-Review) V. I. Muronetz, D. V. Pozdyshev, M. V. Medvedeva, and I. A. Sevostyanova	205
Mechanism of Energy Storage and Transformation in Mitochondria at the Water-Membrane	
S. V. Nesterov, E. G. Smirnova, and L. S. Yaguzhinsky	216
Studying of Molecular Regulation of Developmental Processes of Lower Metazoans Exemplified by Cnidaria Using High-Throughput Sequencing (Review)	
T. V. Erofeeva, A. P. Grigorenko, F. E. Gusev, I. A. Kosevich, and E. I. Rogaev	230
 Genomics of Ancient Pathogens: First Advances and Prospects (Review) A. B. Malyarchuk, T. V. Andreeva, I. L. Kuznetsova, S. S. Kunizheva, M. S. Protasova, L. I. Uralsky, T. V. Tyazhelova, F. E. Gusev, A. D. Manakhov, and E. I. Rogaev 	258
Opsine Genes Expression in Eye Retina of Female and Male Threespined Sticklebacks Gasterosteus aculeatus L. Depends on Freshwater Adaptation and Prolactin	278
IV. 5. Tuviova, A. K. Olzanama, T. V. Merenna, and O. V. Smirnova	270

Focus on Molecular Functions of Anti-Aging Deacetylase SIRT3 J. Nahálková

289

УДК 577.112;617.741

КРИСТАЛЛИНЫ КАК ВАЖНЫЕ ПАТОГЕННЫЕ МИШЕНИ ПРИ НАКОПЛЕНИИ СТРУКТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ И РАЗВИТИЮ КАТАРАКТЫ

© 2022 R. Yousefi^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran; e-mail: yousefi.reza@ut.ac.ir, ryousefi@shirazu.ac.ir ² Protein Chemistry Laboratory, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran

> Поступила в редакцию 29.01.2022 После доработки 29.01.2022 Принята к публикации 29.01.2022

Этот выпуск журнала «Биохимия» посвящён роли нарушения упорядоченности и последующей агрегации белков в развитии катаракты. Фактически многие генетические мутации или химические и физические вредные воздействия могут инициировать изменения в упорядоченности макроструктуры и правильной сборке белков в хрусталике, что в некоторых случаях приводит к образованию крупных светорассеивающих агрегатов, влияющих на качество зрения и делающих хрусталик более уязвимым для развития катаракты. Сахарный диабет, связанный с окислительным стрессом и массовой продукцией высокореактивных соединений, может ускорить развёртывание и агрегацию белков хрусталика глаза. В этом выпуске представлены обзоры и исследовательские статьи, описывающие разрушительное воздействие мутаций и высокореактивных метаболитов на структуру и функцию белков хрусталика — кристаллинов, а также описывающие важные молекулы, участвующие в системе естественной защиты хрусталика от вредных воздействий физических и химических факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белки хрусталика, мутации, сахарный диабет, активные вещества, система естественной защиты хрусталика.

DOI: 10.31857/S0320972522020014

введение

Этот выпуск, посвящённый роли нарушения упорядоченности и последующей агрегации белков при катаракте, подготовлен по предложению и при участии Бориса Ивановича Курганова, главного научного сотрудника Института биохимии им. Баха, заслуженного деятеля науки РФ, скончавшегося 1 октября 2021 г. Его многочисленные исследования в области энзимологии, механизмов агрегации белков и роли молекулярных и химических шаперонов в предотвращении агрегации белков, продолжавшиеся более шести десятилетий, оставили важное и ценное научное наследие. Борис Курганов также сыграл заметную роль в изучении механизма агрегации белков хрусталика глаза – кристаллинов, которые играют значительную роль в обеспечении прозрачности и коэффициента преломления в тканях хрусталика [1].

КРИСТАЛЛИНЫ КАК ВАЖНЫЕ МИШЕНИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРИ НАКОПЛЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Эти водорастворимые структурные белки, обнаруженные в хрусталиках глаз позвоночных,

подразделяются на три основные типа (α -, β - и γ -кристаллины), которые элюируются с колонки для гель-фильтрации в том же порядке в соответствии с различиями в размере и степени олигомеризации [2]. α -Кристаллины (α A и α B) и β -кристаллины (β A1, β A2, β A3, β A4, β B1, β B2 и β B3; A – кислые; B – основные) образуют соответственно более длинные и более короткие олигомеры, тогда как γ -кристаллины (γ A, γ B, γ C, γ D, γ E, γ F, γ N и γ S) являются в основном мономерами [3].

Кристаллины богаты чрезвычайно стабильными структурами бета-листов, тонко взаимодействующих друг с другом, что очень важно для прозрачности хрусталика [1, 4]. В дополнение к нарушению таких важных тонких белок-белковых взаимодействий, генетические мутации и накопление физических и химических повреждений в течение жизни приводят к структурным изменениям и обнажению гидрофобных областей белка. В конечном счёте эти неблагоприятные молекулярные события вызывают развёртывание и последующую агрегацию кристаллинов хрусталика, что приводит к развитию катаракты, являющейся наиболее распространённой причиной слепоты во всём мире, поражая десятки миллионов людей [5-9]. Помимо ткани хрусталика, кристаллины (например, αВ-кристаллин) обнаружены и в других тканях, таких как сетчатка глаза, сердце, скелетные мышцы, кожа, мозг и др. [10, 11]. Таким образом, структурные и функциональные повреждения этих белков также связаны с другими нарушениями, включая миопатию, неврологические проблемы, заболевания сердца, мышечные расстройства и инвазивные раковые опухоли молочной железы [12–15]. Наряду со структурной ролью, кристаллины выполняют ряд метаболических и регуляторных функций как внутри, так и вне тканей хрусталика [16]. Хотя сообщалось о ферментативной активности некоторых типов кристаллинов [17], их наиболее важная биологическая функция, вероятно, связана с шаперонной активностью α-кристаллина, который играет жизненно важную роль в предотвращении и замедлении развития катаракты и повышает устойчивость клеток к различным типам химического и физического стресса [18, 19]. Этот шаперон, принадлежащий к семейству белков теплового шока (hsp), также играет важную роль в ингибировании апоптоза и ремоделировании цитоскелета [20, 21]. Кристаллины представляют собой очень прозрачный матрикс с высоким показателем преломления и с аномальными свойствами гидратации. Они сопротивляются развёртыванию и агрегации в течение десятилетий жизни человека [22]. Однако мутации и накопление физических и химических повреждений в конечном итоге вызывают развёртывание и агрегацию этих белков [23]. Кроме того, некоторые заболевания (например, лиабет). характеризующиеся повышенным уровнем окислительных соединений и активных метаболитов (сахаров и производных сахаров) в хрусталиках, увеличивают степень повреждения структуры кристаллинов и тем самым ускоряют процесс образования катаракты [24, 25]. Мутации в генах двух субъединиц α-кристаллина связаны с доминантной и рецессивной формами катаракты, а также с широким спектром неврологических, сердечно-сосудистых и мышечных заболеваний [2-28]. Мутации, вызывающие тяжёлые повреждения этих белков, обычно приводят к врождённой катаракте, в то время как более лёгкие мутации повышают восприимчивость хрусталика к повреждению окружающей среды и связаны с возрастным развитием катаракты [29]. Также с возрастом постепенное накопление повреждений, вызванных различными факторами, такими как ультрафиолетовое излучение [30], окислительные процессы [31], дезамидирование [32] и протеолиз [33], приводит к образованию белковых агрегатов, рассеивающих частицы света, попадающие на хрусталик. Многочисленные исследования также показали, что аномальные уровни основных элементов (кальция, меди и цинка) и тяжёлых металлов (двухвалентного свинца, кадмия и ртути) являются важными источниками деструктивных повреждений белков кристаллинов, и при некоторых обстоятельствах их можно рассматривать как потенциальную причину развития катаракты [34-37]. Так, заболевания, повышающие уровень основных металлов в хрусталиках (например, сахарный диабет), также вызывают структурные повреждения белков хрусталика и приводят к их агрегации, что ещё больше способствует развитию осложнений при катаракте [38, 39]. Хотя при катаракте единственным доступным в настоящее время лечением является хирургическое удаление хрусталика, научное и медицинское сообщество давно ищет и недеструктивные методы лечения. В связи с этим были предложены методы лечения, основанные на использовании натуральных продуктов [40], модуляторов процессов окисления [41], ингибиторов агрегации белков (например, химических шаперонов) [42], гомеопатических средств [43], регенерации хрусталика с помощью эндогенных стволовых клеток [44].

Ниже я кратко представлю статьи этого специального выпуска [51, 53, 57, 58, 60]. В течение многих лет исследовательская группа профессора Бориса Курганова разрабатывала методы оценки действия молекулярных и химических шаперонов, а также эффектов их совместного применения в действии на кинетику агрегации белков [45-50]. В продолжение этих исследований Chebotareva et al. [51] исследовали влияние трегалозы, как химического шаперона, на четвертичную структуру и шаперонную активность αВ-кристаллина. Зрелые волокнистые клетки содержат чрезвычайно высокую концентрацию белков кристаллинов, которые составляют около 90% от сухого веса хрусталика человека [52]. Так как белки хрусталика постоянно подвергаются физическим и химическим повреждениям, клетки выработали систему естественной защиты для противодействия вредным воздействиям факторов окружающей среды на белки хрусталика. Однако в случае заболеваний (таких как диабет) или старения, преобладание повреждающих факторов над двумя важными системами естественной защиты (шаперонной и антиоксидантной защитными системами) может оказать серьёзное разрушительное воздействие на структуру и функцию белков хрусталика. Различные подходы для предотвращения помутнения хрусталика, в частности, комбинированное использование антиоксидантов и химических молекул, были рассмотрены Muranov и Ostrovsky [53]. Сахарный диабет является одной из при-

чин быстрого развития катаракты. Помимо окислительного стресса, это нарушение метаболизма характеризуется повышенной концентрацией в тканях хрусталика активных метаболитов, таких как глюкоза, фруктоза, фосфорилированные сахара (промежуточные продукты гликолиза), метилглиоксаль, пероксинитрит и сорбит [54]. Окислительный стресс, характерный для диабета, способствует реакции между сахарами или производными сахара и белками хрусталика глаза [55]. Осмотический стресс, вызванный повышенным накоплением сорбита в хрусталике глаза при гипергликемии, является одним из механизмов развития диабетической катаракты [56]. Поэтому влияние различных концентраций сорбита на структуру и шапероноподобную активность кристаллина крысы было изучено Reddy et al. [57]. Влияние пероксинитрита (важного источника окислительного стресса при диабете), метилглиоксаля (активного карбонильного соединения, связанного с диабетом) и их одновременное действие на структуру и функцию рекомбинантного αА-кристаллина человека и защитную роль аскорбиновой кислоты и глутатиона (основных компонентов системы антиоксидантной защиты хрусталика) исследовали Yousefi et al. [58]. Многие мутации,

обнаруженные в генах, кодирующих белки кристаллины, связаны с такими заболеваниями, как катаракта и миопатия [59]. И в завершении, роль генетических мутаций α-кристаллинов в их структурном развёртывании и агрегации обсуждают в своей работе Rao et al. [60].

Этот выпуск был инициирован и до недавнего времени создавался при значительном вкладе профессора Курганова, завершать выпуск пришлось уже без него. Мы посвящаем этот выпуск журнала памяти профессора Бориса Ивановича Курганова. Его непрерывные усилия на протяжении последних десятилетий и его ценное и значительное научное наследие проложили путь другим исследователям к неизведанным рубежам знаний.

Финансирование. Данная работа была поддержана Национальным научным фондом Ирана, INSF (грант № 99014455).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания исследований с участием людей или животных, проведённых автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Delaye, M. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency, *Nature*, **302**, 415-417.
- Bloemendal, H. (1977) The vertebrate eye lens, *Science*, 197, 127-138.
- 3. Lampi, K. J., Ma, Z., Shih, M., Shearer, T. R., Smith, J. B., et al. (1997) Sequence analysis of betaA3, betaB3, and betaA4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens, *J. Biol. Chem.*, **272**, 2268-2275.
- 4. Benedek, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye, *Appl. Opt.*, **10**, 459-473.
- 5. Bera, S., and Abraham, E. C. (2002) The α A-crystallin R116C mutant has a higher affinity for forming heteroaggregates with α B-crystallin, *Biochemistry*, **41**, 297-305.
- Basha, E., O'Neill, H., and Vierling, E. (2012) Small heat shock proteins and α-crystallins: Dynamic proteins with flexible functions, *Trends Biochem. Sci.*, 37, 106-117.
- flexible functions, *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 106-117.
 Bron, A. J., Vrensen, G., Koretz, J., Maraini, G., and Harding, J. (2000) The ageing lens, *Opthalmologica*, **214**, 86-104.
- 8. Takemoto, L. J., and Ponce, A. A. (2006) Decreased association of aged alpha crystallins with gamma crystallins, *Exp. Eye Res.*, **83**, 793-797.
- 9. Treweek, T. M., Rekas, A., Lindner, R. A., Walker, M. J., Aquilina, J. A., et al. (2005) R120G α B-crystallin promotes the unfolding of reduced α -lactalbumin and is inherently unstable, *FEBS J.*, **272**, 711-724.
- Dubin, R. A., Wawrousek, E. F., and Piatigorsky, J. (1989) Expression of the Murine αB-crystallin gene is not restricted to the lens, *Mol. Cell Biol.*, 9, 1083-1091.
- 11. Sax, C. M., and Piatigorsky, J. (1994) Expression of the alpha-crystallin/small heat-shock protein/molecular

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

chaperone genes in the lens and other tissues, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **69**, 155-201.

- 12. Koletsa, T., Stavridi, F., Bobos, M., Kostopoulos, I., Kotoula, V., et al. (2014) alphaB-crystallin is a marker of aggressive breast cancer behavior but does not independently predict for patient outcome: A combined analysis of two randomized studies, *BMC Clin. Pathol.*, **14**, 1-13.
- 13. Rajasekaran, N. S., Connell, P., Christians, E. S., Yan, L., Taylor, R. P., et al. (2007) Human alphaB-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice, *Cell*, **130**, 427-439.
- Simon, S., Fontaine, J., Martin, J. L., Sun, X., Hoppe, A. D., et al. (2007) Myopathy-associated alphaB-crystallin Mutants abnormal phosphorylation, intracellular location, and interactions with other small heat shock proteins, *J. Biol. Chem.*, 282, 34276-34287.
- Avliyakulov, N. K., Rajavel, K. S., Minh, K., Haykinson, M. J., and Pope, W. B. (2014) C-terminally truncated form of alphaB-crystallin is associated with IDH1 R132H mutation in anaplastic astrocytoma, *J. Neurooncol.*, 117, 53-65.
- Boelens, W. C. (2014) Cell biological roles of αB-crystallin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **115**, 3-10.
- 17. Wistow, G., and Kim, H. (1991) Lens protein expression in mammals: Taxon-specificity and the recruitment of crystallins, *J. Mol. Evol.*, **32**, 262-269.
- 18. Horwitz, J. (1992) a-Crystallin can function as a molecular chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449-10453.
- 19. Andley, U. P. (2007) Crystallins in the eye: Function and pathology, *Prog. Retin. Eye Res.*, **26**, 78-98.
- 20. Van Montfort, R., Slingsby, C., and Vierlingt, E. (2001) Structure and function of the small heat shock protein/

 α -crystallin family of molecular chaperones, *Adv. Protein Chem.*, **59**, 105-156.

- 21. Pasupuleti, N., Matsuyama, S., Voss, O., Doseff, A. I., Song, K., et al. (2010) The anti-apoptotic function of human α A-crystallin is directly related to its chaperone activity, *Cell Death Dis.*, **1**, e31-e31.
- Roskamp, K. W., Paulson, C. N., Brubaker, W. D., and Martin, R. W. (2020) Function and aggregation in structural eye lens crystallins, *Acc. Chem. Res.*, 53, 863-874.
- Clark, A. R., Lubsen, N. H., and Slingsby, C. (2012) sHSP in the eye lens: Crystallin mutations, cataract and proteostasis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44, 1687-1697.
- Yousefi, R., Javadi, S., Amirghofran, S., Oryan, A., and Moosavi-movahedi, A. A. (2016) Assessment of structure, stability and aggregation of soluble lens proteins and alphacrystallin upon non-enzymatic glycation: The pathomechanisms underlying cataract development in diabetic patients, *Int. J. Biol. Macromol.*, 82, 328-338.
- Zafaranchi, S., Khoshaman, K., Masoudi, R., Hemmateenejad, B., and Yousefi, R. (2017) The structural alteration and aggregation propensity of glycated lens crystallins in the presence of calcium: Importance of lens calcium homeostasis in development of diabetic cataracts, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 170, 174-183.
- 26. Dimauro, I., Antonioni, A., Mercatelli, N., and Caporossi, D. (2018) The role of α B-crystallin in skeletal and cardiac muscle tissues, *Cell Stress Chaperones*, **23**, 491-505.
- Shiels, A., Hejtmancik, J. F., Sciences, V., and Branch, V. F. (2017) Mutations and mechanisms in congenital and age-related cataracts, *Exp. Eye Res.*, **156**, 95-102.
- Phadte, A. S., Sluzala, Z. B., and Fort, P. E. (2021) Therapeutic potential of α-crystallins in retinal neurodegenerative diseases, *Antioxidants*, 10, 1-13.
- Pescosolido, N., Barbato, A., Giannotti, R., Komaiha, C., and Lenarduzzi, F. (2016) Age-related changes in the kinetics of human lenses: Prevention of the cataract, *Int. J. Ophthalmol.*, 9, 1506.
- Varma, S. D., Kovtun, S., and Hegde, K. R. (2011) Role of UV irradiation and oxidative stress in cataract formation. Medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists, *Eye Contact Lens*, 37, 233-245.
- Linetsky, M., Shipova, E., Cheng, R., and Ortwerth, B. J. (2008) Glycation by ascorbic acid oxidation products leads to the aggregation of lens proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1782, 22-34.
- Pande, A., Mokhor, N., Pande, J., and States, U. (2018) Deamidation of human γS-crystallin increases attractive protein interactions: Implications for cataract, *Biochemistry*, 54, 4890-4899.
- Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., et al. (1997) Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice, *Cell*, **91**, 833-843.
- Kashani, M. R., Yousefi, R., Akbarian, M., Alavianmehr, M. M., and Ghasemi, Y. (2016) Structure, chaperone activity, and aggregation of wild type and R12C mutant αB crystallins in the presence of thermal stress and calcium ion – implications for role of calcium in cataract pathogenesis, *Biochemistry*, **81**, 122-134.
 Ghahramani, M., Yousefi, R., Khoshaman, K., Sasan, S.,
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Khoshaman, K., Sasan, S., and Kurganov, B. I. (2016) Evaluation of structure, chaperone-like activity and protective ability of peroxynitrite modified human alpha-Crystallin subunits against coppermediated ascorbic acid oxidation, *Int. J. Biol. Macromol.*, 87, 208-221.
- Calva, J. A. D., Vázquez, M. L. P., and King, J. A., and Quintanar, L. (2018) Mercury-induced aggregation of human lens γ-crystallins reveals a potential role in cataract disease, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 23, 1105-1118.

- Kempka, K., Kaminski, P., Malukiewicz, G., Bogdzinska, M., and Florczak, S. (2018) Initial proantioxidant reactions in the patients suffering from cataract in the interactions with cadmium and lead, *World Sci.*, 108, 195-206
- 38. Kyselova, Z., Stefek, M., and Bauer, V. (2004) Pharmacological prevention of diabetic cataract, *J. Diabetes Complicat.*, **18**, 129-140.
- Moreau, K. L., and King, J. A. (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention, *Trends Mol. Med.*, 18, 273-282.
- 40. Kato, K., Ito, H., Kamei, K., and Iwamoto, I. (1998) Stimulation of the stress-induced expression of stress proteins by curcumin in cultured cells and in rat tissues *in vivo*, *Cell Stress Chaperones*, **3**, 152.
- Khoshaman, K., Yousefi, R., and Moosavi-Movahedi, A. A. (2017) Protective role of antioxidant compounds against peroxynitrite-mediated modification of R54C mutant a A-crystallin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 629, 43-53.
- 42. Jara, O., Minogue, P. J., Berthoud, V. M., and Beyer, E. C. (2018) Chemical chaperone treatment improves levels and distributions of connexins in Cx50D47A mouse lenses, *Exp. Eye Res.*, **175**, 192-198.
- 43. Lian, R. R., and Afshari, N. A. (2020) The quest for homeopathic and nonsurgical cataract treatment, *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **31**, 61-66.
- Liu, Z., Wang, R., Lin, H., and Liu, Y. (2020) Lens regeneration in humans: using regenerative potential for tissue repairing, *Ann. Transl. Med.*, **8**, 1-17.
 Mikhaylova, V., Eronina, T., and Kurganov, B. (2021) The
- 45. Mikhaylova, V., Eronina, T., and Kurganov, B. (2021) The effect of chemical chaperones on test systems with different kinetic regime of aggregation, *FEBS Open Bio*, **11**, 170-170.
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Krivandin, A., Muranov, K., Kurganov, B., et al. (2020) Kinetic data analysis of chaperone-like activity of Wt, R69C and D109H αB-crystallins, *Data in Brief*, 28, 104922.
- 47. Kurganov, B. I. (2017) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones, *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 104-117.
- 48. Kurganov, B. I. (2015) Selection of test systems for estimation of anti-aggregation activity of molecular chaperones, *Biochem. Anal. Biochem.*, **4**, 1.
- Kurganov, B. I. (2014) Estimation of chaperone-like activity using test systems based on protein amyloid aggregation, *Biochem. Anal. Biochem.*, 4, doi: 10.4172/2161-1009.1000160.
- 50. Borzova, V. A., Markossian, K. A., Kara, D. A., Chebotareva, N. A., Makeeva, V. F., et al. (2013) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones: A test-system based on dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin, *PLoS One*, **8**, e74367.
- 51. Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Mikhaylova, V., Roman, S. G., Tugaeva, K. V., et al. (2022) Effect of trehalose on oligomeric state and anti-aggregation activity of α B-Crystallin, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 121-130.
- 52. Sharma, K. K., and Santhoshkumar, P. (2009) Lens aging: Effects of crystallins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1095-1108.
- 53. Muranov, K. O., and Ostrovsky, M. O. (2022) Lens biochemistry in the norm and in cataractogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 106-120.
- 54. Moghadam, S. S., Oryan, A., Kurganov, B. I., Tamaddon, A. M., Alavianehr, M. M., et al. (2017) The structural damages of lens crystallins with peroxynitrite and methyl-glyoxal, two causetive players in diabetic complications and preventive role of lens antioxidant components, *Int. J. Biol. Macromol.*, **103**, 74-88.
- 55. Stitt, A. (2005) The maillard reaction in eye disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 582-597.

- 56. Patel, D. K., Prasad, S. K., Kumar, R., and Hemalatha, S. (2011) Cataract: A major secondary complication of diabetes, its epidemiology and an overview on major medicinal plants screened for anticataract activity, *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 1, 323-329.
- Kumar, C. U., Suryavanshi, U., Sontake, V., Reddy, P. Y., Sankhala, R. S., et al. (2022) Effects of sorbitol on alphacrystallin structure and function, *Biochemistry (Moscow)*, 87, 131-140.
- 58. Sasan Moghadam, S., Ghahramani, M., Khoshaman, K., Oryan, A., Moosavi-Movahedi, A. A., et al. (2022)

Relationship between the structure and chaperone activity of human α A-Crystallin after its modification with diabetes-associated oxidative agents and protective role of antioxidant compounds, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 91-105.

- 59. Graw, J. (2009) Genetics of crystallins: Cataract and beyond, *Exp. Eye Res.*, **88**, 173-189.
- Budnar, B., Tangirala, R., Bakthisaran, R., and Rao, C. M. (2022) Protein aggregation and cataract: Role of age-related modifications and mutations in α-crystallins, *Biochemistry (Moscow)*, in press.

CRYSTALLINS AS IMPORTANT PATHOGENIC TARGETS FOR ACCUMULATION OF STRUCTURAL DAMAGES RESULTING IN PROTEIN AGGREGATION AND CATARACT DEVELOPMENT

R. Yousefi^{1,2}

 ¹ Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran; e-mail: yousefi.reza@ut.ac.ir, ryousefi@shirazu.ac.ir
 ² Protein Chemistry Laboratory, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran

This issue of *Biochemistry (Moscow)* is dedicated to the role of protein misfolding and aggregation in cataract development. In fact, many genetic mutations or chemical and physical deleterious factors can initiate alterations in the macrostructural order and proper folding of eye lens proteins, which in some cases result in the formation of large light-scattering aggregates, affecting the quality of vision and making lens more prone to cataract development. Diabetes mellitus, which is associated with oxidative stress and mass production of highly reactive compounds, can accelerate unfolding and aggregation of eye lens proteins. This journal issue contains reviews and research articles that describe the destructive effects of mutations and highly reactive metabolites on the structure and function of lens crystallin proteins, as well important molecules in the lens's natural defense system involved in protection against deleterious effects of the physical and chemical factors.

Keywords: lens proteins, mutations, diabetes mellitus, reactive substances, lens natural defense system

УДК 577.112.7;617.741

СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ αА-КРИСТАЛЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ЕГО МОДИФИКАЦИИ АССОЦИИРОВАННЫМИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМИ АГЕНТАМИ И ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ МОЛЕКУЛ

© 2022 S.S. Moghadam¹, M. Ghahramani¹, K. Khoshaman¹, A. Oryan², A.A. Moosavi-Movahedi³, B.I. Kurganov⁴, and R. Yousefi^{1,3*}

 ¹ Protein Chemistry Laboratory, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran; e-mail: ryousefi@shirazu.ac.ir; r.yousefi2000@gmail.com
 ² Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
 ³ Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran
 ⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

> Поступила в редакцию 12.09.2021 После доработки 16.10.2021 Принята к публикации 16.10.2021

Целью исследования было оценить влияние пероксинитрита (PON, areнт окислительного стресса при диабете), метилглиоксаля (MGO, диабет-ассоциированное реактивное карбонильное соединение) и их одновременного воздействия на структурные и функциональные характеристики αА-кристаллина человека (αA-Cry) с помощью различных методов спектроскопии. Кроме того, с помощью метода тензиометрического анализа и метода динамического светорассеяния были определены такие параметры, как поверхностное натяжение и размеры олигомеров обработанного и необработанного белка. Наши результаты показали, что инкубация PON и MGO с αA-Cry человека приводит к образованию новых хромофоров, вызывает изменения в структурах этого белка (от вторичной и до четвертичной), уменьшение размера белковых олигомеров и значительное усиление шаперонной активности αA-Cry. Для отмены действия протестированных химических соединений применяли аскорбиновую кислоту и глутатион (основные компоненты антиоксидантной защиты хрусталика глаза). Как ожидалось, оба изученных антиоксиданта в значительной степени предотвращают образование высокомолекулярных агрегатов белка αA-Cry (по результатам SDS-ПААГ). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что антиоксидантная защита клеток хрусталика, в частности глутатион, может обеспечивать эффективную защиту от быстрого возникновения и прогрессирования диабетической катаракты, предотвращая деструктивные реакции высокореактивных метаболитов, ассоциированных с сахарным диабетом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: αА-кристаллин человека, диабетическая катаракта, антиоксиданты хрусталика глаза, структура белка, шаперонная активность.

DOI: 10.31857/S0320972522020026

ВВЕДЕНИЕ

Высокореакционноспособные химические соединения, ассоциированные с сахарным диабетом (СД), обычно подразделяют на соединения, содержащие карбонильные группы, и оксиданты. Следовательно, СД рассматривается как нарушение обмена веществ, связанное как с окислительным, так и с карбонильным стрессом]1[. К карбонильным соединениям, содержание которых в организме увеличивается при СД, относятся многие сахара и производные сахаров, различные формы продуктов окисления аскорбиновой кислоты и высокореакционноспособные побочные продукты метаболизма, такие как метилглиоксаль (MGO) и малоновый диальдегид (MDA) [2, 3]. Кроме того, СД вызывает повышение содержания в организме различных активных форм кислорода (ROS) и активных форм азота (RNS). Наиболее известным представителем активных форм азота является

Принятые сокращения: СД – сахарный диабет; α A-Cry – α A-кристаллин; AGE – конечный продукт гликирования; ANS – 1-анилино-8-нафталиносульфонат; ASA – аскорбиновая кислота; DLS – динамическое светорассеяние, dynamic light scattering; α -Gls – α -глюкозидаза; GSH – глутатион; HMM – высокая молекулярная масса; MGO – метилглиоксаль; PON – пероксинитрит; ThT – тиофлавин Т.

^{*} Адресат для корреспонденции.

пероксинитрит (PON) [4]. Реакционноспособные соединения, ассоциированные с СД, могут взаимодействовать с широким кругом биомолекул, в частности с долгоживущими белками, вызывая в них структурные и функциональные повреждения и создавая предпосылки для возникновения серьёзных осложнений, связанных с данным нарушением обмена веществ [5]. Кристаллины хрусталика глаза в силу длительного периода полураспада и ограниченного обновления являются одними из важных молекулярных мишеней для реакционноспособных соединений, ассоциированных с СД. С течением времени в кристаллинах накапливаются многочисленные химические модификации, которые в конечном итоге вызывают серьёзные структурные повреждения, приводя к денатурации и агрегации белка, что служит основной причиной рассеяния света в тканях хрусталика [6]. По этим причинам СД играет важную роль в развитии катаракты. Недавние исследования показывают, что у людей с диабетом вероятность развития катаракты в 2-5 раз выше, чем у людей без диабета [7]. Более того, у больных сахарным диабетом катаракта формируется в более молодом возрасте и быстрее прогрессирует [8].

Три основные группы белков (α-, β- и γкристаллины) имеют высокую концентрацию в тканях хрусталика позвоночных. Они образуют прозрачный матрикс с высоким показателем преломления [9]. Эти белки богаты чрезвычайно стабильными структурами бета-листов, которые играют важную структурную роль в хрусталике глаза [10]. α-Кристаллин (α-Сгу) состоит из субъединиц αА и αВ и принадлежит к семейству белков теплового шока. Он защищает хрусталики глаза от накопления в них развёрнутых белковых структур [11]. В целом, любой внутренний или внешний фактор, влияющий на структуру и функцию кристаллинов или вызывающий какое-либо изменение взаимодействий между этими белками, будет существенно влиять на качество зрения [12]. Генетические мутации и посттрансляционные неферментативные модификации являются двумя основными факторами, которые могут повреждать нативную структуру кристаллинов хрусталика, приводя к денатурации белков и образованию крупных светорассеивающих агрегатов в тканях хрусталика [13, 14]. Диабетическая катаракта, по-видимому, является частью многофакторного механизма, и несколько реактивных метаболитов способствуют развитию помутнения хрусталика наряду с хроническим повышением содержания сахара в крови [15]. Поскольку одними из наиболее важных факторов, приводящих к осложнениям при СД, считаются карбонильный и окислительный

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

стресс, мы изучили роль MGO (реакционноспособный карбонильный метаболит) и PON (ассоциированный с диабетом оксидант) в структурных и функциональных нарушениях αA-Cry человека. Высокореактивный карбонильный метаболит MGO вступает в реакцию с аминогруппами в белке с образованием шиффовых оснований, которые затем превращаются в продукты Амадори. Этот деструктивный путь приводит к образованию высокотоксичных для клетки аддуктов белка и сахаров, которые хорошо известны как конечные продукты гликирования (AGE) [16]. Кроме того, диабет и воспалительные процессы сопровождаются образованием в тканях радикалов супероксида и оксида азота, и эти два соединения способны образовывать PON, который, в свою очередь, является основным окислителем и сильным нитрующим агентом [17]. С другой стороны, окислительная среда, создаваемая этими соединениями в организме больных диабетом, способна катализировать реакции белков с реакционноспособными и содержащими карбонильные группы соединениями, приводя к образованию AGE [18–20]. Есть сообщения об одновременном повышении уровня MGO и PON у больных с хронической гипергликемией и катарактой, что может привести к серьёзным повреждениям биомолекул хрусталика глаза, особенно кристаллинам [21, 22]. В хрусталиках глаза имеется сильная антиоксидантная защитная система, которая может противостоять деструктивному влиянию окислительных агентов, создавать восстановительную среду, в которой существенно понижается скорость реакций между карбонильными соединениями и белками [23]. В этом исследовании мы провели изучение характера структурных повреждений, вызванных воздействием MGO и PON и их комбинации на рекомбинатный белок αA-Cry человека. Мы также изучили способность двух основных антиоксидантов хрусталика глаза человека, а именно: глутатиона (GSH) и аскорбиновой кислоты (ASA), устранять эффекты связанных с СД реактивных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Кумасси бриллиантовый голубой (CBB), β-меркаптоэтанол (β-ME), 1-анилино-8-нафталиносульфонат (ANS), тиофлавин T (ThT), GSH и другие реагенты были получены от компании «Sigma-Aldrich» (США). Канамицин и изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) поступили от компании «Merck» (США). Для приготовления всех растворов использовали дважды дистиллированную воду.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка аА-Сту. Клетки Escherichia coli BL21 (DE3) трансфицировали кДНК αА-Сгу человека, клонированной в вектор экспрессии pET-28(b+), и их использовали для получения рекомбинантного белка. Вкратце, клетки выращивали в стерильной культуральной среде (LB) при 37 °С в течение 16 ч. Экспрессию рекомбинантного белка αA-Cry индуцировали добавлением IPTG (0,25 мМ). После завершения инкубации клетки центрифугировали и затем лизировали ультразвуком. Рекомбинантный белок выделяли из супернатанта с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой и последующей гель-фильтрации на колонке с Sephacryl S-300 [24-26]. Для оценки чистоты полученных препаратов белка использовали электрофорез в SDS-ПААГ (в 12%-ном геле). Очищенный αA-Cry человека лиофилизировали и до его дальнейшего использования в экспериментах хранили при −20 °С.

Синтез РОN и модификация белка пероксинитритом. РОN синтезировали, используя реакцию холодных растворов 0,6 М нитрита натрия и 0,7 М перекиси водорода в 0,6 М соляной кислоте в ледяной бане [27]. Реакцию быстро останавливали добавлением гидроокиси натрия (1,5 М). Чистоту РОN определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента молярного поглощения — 1670 М⁻¹ см⁻¹ при длине волны 302 нм [28]. Конечный раствор (чистый препарат PON) замораживали и хранили при –20 °С.

Рекомбинантный белок (3 мг/мл) инкубировали с 2 мМ РОN при комнатной температуре в течение 30 мин в 5 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 10 мМ бикарбонат натрия при рН 7,4 (буфер А). После завершения реакции, для удаления избытка РОN, белковый раствор подвергали диализу дважды в течение 24 ч против дистиллированной воды. Модификацию белка пероксинитритом подтверждали путём определения остатков нитротирозина, нитротриптофана и дитирозина с помощью УФвидимой (UV-Vis) спектрофотометрии [29, 30].

Неферментативное гликирование α A-Cry человека. α A-Cry человека (3 мг/мл) инкубировали с 5 мМ MGO в 200 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,01%-ный азид натрия, в темноте при 37 °C в течение трех дней. Затем образцы белка подвергали диализу против фосфатного буфера в течение 24 ч, чтобы удалить не вступившие в реакцию производные сахаров. α A-Cry (3 мг/мл) также модифицировали смесью PON (2 мМ) и MGO (5 мМ) в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,01%-ный азид натрия (pH 7,4) в течение 30 мин. Избыток реагентов в образцах удаляли диализом [31].

Флуоресцентный анализ. Изменения структуры рекомбинантного αA-Сгу человека (0,15 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4) после его модификации реагентами MGO и PON анализировали по внутренней (Trp/Tyr) и внешней (ANS) флуоресценции с использованием спектрофотометра Cary-Eclipse. Остатки тирозина и триптофана возбуждали при длинах волн 280 и 295 нм соответственно [32, 33]. Для определения флуоресценции дитирозина образцы белков подвергали возбуждению при длине волны 320 нм [34].

Для оценки содержания экспонированных гидрофобных участков использовали значения флуоресценции ANS. α A-Cry человека инкубировали с 100 мкМ ANS в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, и регистрировали спектры эмиссии в диапазоне длин волн 400–600 нм при фиксированной длине волны возбуждения, равной 365 нм.

Для определения возможного образования амилоидных фибрилл белка использовали ThT [35, 36]. С этой целью белки в концентрации 0,15 мг/мл инкубировали с ThT (конечная концентрация – 20 мкМ) в течение 5 мин при комнатной температуре. Растворы белков возбуждали при длине волны 440 нм и регистрировали спектры эмиссии в диапазоне длин волн 450–600 нм.

Определение кругового дихроизма белка в дальнем ультрафиолетовом диапазоне. Изменения вторичной структуры αA-Cry человека изучали с помощью метода спектрометрии кругового дихроизма (КД). Эти эксперименты проводили при фиксированной концентрации белка (0,2 мг/мл), в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7 и 25 °C с использованием спектрополяриметра («JASCO», Япония). Длина оптического пути была равна 0,1 см. Полученные спектры КД в дальнем ультрафиолетовом диапазоне выражали в виде молярной эллиптичности. Процентное содержание элементов вторичной структуры рассчитывали с использованием сервера DICHROWEB с помощью алгоритма CONTIN [37].

Определение хромофоров AGE. Образование различных хромофоров AGE в αA-Сгу человека определяли флуориметрически [38] в растворе белка (0,15 мг/мл) в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7,4. Были проанализированы различные хромофоры конечных продуктов гликирования (AGE), такие как аргпиримидин (возбуждения при 322 и 381 нм), K2P [1-(5-амино-5-карбоксипентил)-4-(5-амино-5-карбоксипентил-амино)-3-гидрокси-2,3-дигидропиридиний; возбуждение при 342 нм], карбоксиметиллизин (возбуждение при 352 нм), пентозидин (возбуж-

дение при 335, 370 и 375 нм) и весперлизин A (возбуждение при 370 нм) [39–42].

Определение поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение раствора белка (1 мг/мл) определяли в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) при 25 °C с использованием тензиометра (Krüss K100) по кольцевому методу Du Noüy [43].

Метод динамического рассеяния света (DLS). Распределение олигомеров αA-Сгу человека по их размеру определяли в образцах белков (1,5 мг/мл), приготовленных в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), при 25 °С с использованием прибора Nanotrac Wave («Microtrac», США). При использовании данного метода лазерный луч с длиной волны 780 нм и под углом 90° отражался белковым образцом [44]. Полученные результаты анализировались с помощью программного обеспечения Microtrac FLEX.

Определение шапероноподобной активности. Шапероноподобную активность α A-Сrу человека, препятствующую агрегации инсулина, определяли при 40 °C на спектрофотометре VisUV Cecil CE 7200 («Cecil Instruments Ltd.», Великобритания), снабжённом регулятором температуры. Регистрировали количество света, отражённого при 360 нм, как функцию времени. Агрегацию инсулина вызвали добавлением дитиотрейтола (DTT). Для количественной оценки шапероноподобной активности α A-Cry использовали следующее уравнение [45, 46]:

% защиты =
$$(1 - A_r/A_{r0}) \times 100$$
, (1)

где A_r и A_{r0} – это площади под поглощением света против времени в присутствии шаперона (α A-Cry) и при его отсутствии соответственно.

Способность α A-Сгу вызывать рефолдинг других белков. Дрожжевая α -глюкозидаза (α -Gls) полностью разворачивалась и инактивировалась в присутствии 8 М мочевины. Затем раствор фермента разводили в 100 раз фосфатным буфером в присутствии α A-Сгу или при его отсутствии. Далее определяли активность α -Gls, и в качестве индекса рефолдинга рассматривали восстановление ферментативной активности [47].

Способность α A-Cry восстанавливать ферментативную активность α -Gls в условиях теплового стресса определяли с помощью термической инактивации дрожжевой α -глюкозидазы. Этот фермент очень чувствителен к высокой температуре, и инкубация при 52 °C через 1 мин приводит к потере его активности на 50%. При 46 °C 50%-ная инактивация фермента достигается примерно за 15 мин [48]. Фермент разводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) до конечной

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

концентрации 0,2 Ед./мл и затем инкубировали при 46 °С в присутствии αA-Cry (0,05 мг/мл) или при его отсутствии. Для определения кинетики процесса инактивации фермента его активность измеряли через каждые 5 мин [49].

Электрофорез белков в SDS-ПААГ. Электрофоретическую подвижность белков в 12%-ном полиакриламидном геле оценивали по стандартному протоколу проведения электрофореза в SDS-ПААГ [50, 51]. На каждую дорожку наносили по 12,5 мкг белка. Для визуализации белковых полос гель окрашивали CBB.

Определение концентрации белка. Чтобы определить концентрацию α A-Cry человека, 1 мг белка растворяли в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), и определяли концентрацию полученного раствора белка на спектрофотометре Т90+ UV-Vis («PG Instruments Ltd.», Китай) при длине волны 280 нм с использованием коэффициента экстинкции 0,725 для 1 мг/мл раствора белка [52, 53]. Концентрацию инсулина (коэффициент экстинкции – 1,08 на 1 мг/мл) определяли путём измерения его поглощения при 276 нм.

Статистический анализ. Для анализа данных использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (One-way ANOVA test) и программу Sigma Plot 12. Значение p < 0.05 рассматривалось как статистически достоверное [54].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка образования ковалентных сшивок в модифицированном белке αA-Cry человека с помощью метода электрофореза в SDS-ПААГ. Белки кристаллины образуют большие олигомерные комплексы, которые играют важную роль в помутнении хрусталика и образовании катаракты [55]. Пероксинитрит (PON) и метилглиоксаль (MGO) способствуют образованию катаракты, индуцируя окислительный и карбонильный стресс соответственно в хрусталиках глаза [56, 57]. Одним из наиболее распространённых методов оценки образования белковых олигомеров большого размера является электрофорез в SDS-ПААГ, который можно проводить как в восстанавливающих условиях, так и при отсутствии восстановителей (рис. 1).

В этом исследовании образцы рекомбинантного αA-Сгу человека, обработанные PON и MGO, подвергали электрофорезу, чтобы оценить степень олигомеризации белков и образование в них перекрестных сшивок [58]. Как показано на рис. 1, в образце, обработанном PON, в невосстанавливающих условиях полоса, соответствующая нативному белку, исчезла, и в то же

время появились белковые олигомеры большого размера. Наблюдались полосы с молекулярными массами примерно 30-35 кДа, указывающие на перекрестные сшивки модифицированного белка. Наличие нескольких белковых полос в восстанавливающих условиях указывало на то, что помимо дисульфидных связей другие ковалентные связи участвовали в образовании агрегатов белков с высокой молекулярной массой (HMM). Обработка αА-Сгу человека метилглиоксалем также приводила к образованию высокомолекулярного белка. Эти агрегаты НММ способствуют развитию катаракты, вызывая помутнение хрусталика и рассеивание падающего света. Как показано на рис. 1, основная часть гликированных белков задерживалась из-за их очень большого размера на границе между концентрирующим и разделяющим гелем [59, 60]. Также на рис. 1 показаны картины электрофоретической подвижности в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях модифицированного MGO белка, которые свидетельствуют о том, что в образовании НММ-агрегатов участвуют ковалентные связи, отличающиеся от дисульфидных ковалентных связей. Более того, при обработке αА-Сгу человека смесью MGO и PON наблюдались значительные изменения электрофоретической подвижности и интенсивности окраски белковых полос. Одновременная обработка белка пероксинитритом и метилглиоксалем также приводила к образованию НММ-агрегатов. Сравнение картин электрофоретического разделения белков в восстанавливающих условиях и без восстановителей не выявило существенных различий, что позволяет предположить, что белковые олигомеры сшиты ковалентными связями, отличными от дисульфидных.

Оценка структуры модифицированного αA-Cry с помощью УФ-видимой (UV-Vis) спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии. По данным UV-Vis спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии, модификация αA-Cry человека метилглиоксалем и пероксинитритом или смесью этих реагентов (MGO + PON) приводила к значительным структурно-функциональным изменениям белка, образованию новых хромофоров и олигомеризации белка. Как показано на рис. 2, а, спектры поглощения белка, обработанного PON, указывают на увеличение количества дитирозина, нитротирозина и нитротриптофана, что видно из величин оптического поглощения при 428 нм ($\varepsilon_{428\mu M} = 4200 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), 400 HM ($\epsilon_{400\text{HM}} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и 330 HM ($\epsilon_{330\text{HM}} = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) соответственно [61–63]. Обработка аА-Сгу человека пероксинитритом вызывала повышение эмиссии между 375 и 405 нм, что предполагает образование дитирозиновых перекрёстных сшивок [64]. Реакция α A-Cry с метилглиоксалем приводила к максимуму поглощения, указывая на образование новых хромофорных групп. Обработка α A-Cry смесью PON и MGO вызывала значительное снижение пика поглощения, расположенного между пиками поглощения α A-Cry после его инкубации или с PON, или с MGO.

Влияние PON и MGO на структуру αA-Cry человека дополнительно оценивали по флуоресценции остатков триптофана, тирозина и дитирозина. Как показано на рис. 2, b и d, белок, модифицированный PON, MGO (гликированный) и смесью PON + MGO, демонстрировал снижение интенсивности флуоресценции остатков тирозина и триптофана. Наше исследование выявило способность PON превращать остатки тирозина и триптофана в новые хромофоры, такие как дитирозин, нитротирозин и нитротриптофан. Согласно нашим предыдущим результатам, для образцов белка, инкубированных с MGO, характерны максимумы на двух длинах волн в этой области из-за переноса энергии от тирозина к новым хромофорам. Значительное снижение интенсивности флуоресценции тирозина и триптофана наблюдали после индивидуальной инкубации αA-Cry человека с PON и MGO [20, 22].

Выявленное снижение интенсивности флуоресценции тирозина и триптофана может быть связано с крупными структурными изменениями в микроокружении остатков ароматических аминокислот. Изучение флуоресценции дитирозина (рис. 2, с) выявило неожиданно сильное увеличение интенсивности флуоресценции белка, обработанного MGO или смесью PON и MGO, в то время как образование дитирозина является специфичным для реакции белка с PON [29]. Поскольку измерения на спектрофотометре в ближнем ультрафиолетовом диапазоне и видимой части спектра показали, что перекрестные ковалентные сшивки с образованием дитирозина происходят только в PON-модифицированном белке, пики высокой интенсивности, которые появляются в белке, обработанном метилглиоксалем, или в образцах белка, инкубированных со смесью PON и MGO, могут быть отнесены на счёт ассоциированных с процессом гликирования хромофоров, пики эмиссии которых перекрываются с пиком дитирозина. Новые пики эмиссии флуоресценции в белках, обработанных MGO, и в меньшей степени – в белке, модифицированном смесью PON + MGO, указывают на образование специфичных хромофоров [22, 29].

Степень экспонирования гидрофобных поверхностей напрямую связана со скоростью аг-



Рис. 1. Результаты проведения электрофореза в SDS-ПААГ αА-Сгу человека. αА-Сгу (3 мг/мл) инкубировали с 2 мМ PON в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) при комнатной температуре в течение 30 мин (дорожка 2); с 5 мМ MGO в 200 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 3 дней при 37 °C (дорожка 3) или со смесью MGO и PON в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение трех дней – при 37 °C (дорожка 4); дорожка 1 – немодифицированный белок αA-Сгу (контроль). Образцы белка анализировали с помощью электрофореза в SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях



Рис. 2. Изучение структуры модифицированного α A-Сгу с помощью UV-Vis спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии. *a* – Спектры поглощения в диапазоне UV-Vis образцов модифицированного α A-Сгу (1 мг/мл) при 200–700 нм. Измерения интенсивности флуоресценции проводили при концентрации белка 0,15 мг/мл. *b*–*d* – Анализ образцов модифицированного α A-Сгу по флуоресценции тирозина, дитирозина и триптофана после их возбуждения при длинах волн 280, 320 и 295 нм соответственно. Спектры эмиссии регистрировали в диапазоне 300–500 нм. Ширину щели фиксировали на уровне 5, 10 и 10 нм для каналов возбуждения и на уровне 10, 20 и 10 нм – для каналов эмиссии для тирозина, дитирозина и триптофана соответственно. *е* – Использование флуоресценции ANS (возбуждение при 365 нм) для оценки гидрофобности поверхности белка. *f* – Регистрация флуоресценции ThT (возбуждение при 440 нм) для определения амилоидогенных свойств модифицированного α A-Сгу

αA-Cry	α-спираль	β-складчатая структура	β-поворот	Случайный клубок
Контроль	4,2	41,1	28,2	26,5
PON	3,9	41,0	28,2	26,8
MGO	6,0	37,9	29,4	26,7
MGO + PON	5,1	39,4	28,9	26,6

Таблица 1. Процентное содержание элементов вторичной структуры в различных образцах белка αА-Сгу

регации белка, а в случае α-Cry влияет на его шаперонную активность. Изменения структуры в модифицированном белке были далее изучены с помощью экспонирования гидрофобных поверхностей белка в раствор с использованием ANS (возбуждение при 365 нм). ANS связывается с гидрофобными участками белка, экспонированными в водную фазу, что приводит к повышению интенсивности флуоресценции [65]. Как показано на рис. 2, е, РОМ-модифицированный белок демонстрировал значительно более низкую интенсивность флуоресценции ANS, чем немодифицированный белок. Флуоресценция ANS в модифицированном метилглиоксалем αA-Cry была немного снижена, что свидетельствует о небольшом снижении гидрофобности поверхности белка. Флуоресценция ANS в αА-Сгу, инкубированном со смесью PON и MGO, немного увеличивалась. Гидрофобность играет важную роль в шаперонной активности αА-Сгу и его связывании с белками-мишенями. Следовательно, изменение количества экспони-



Рис. 3. Изучение структуры белка αA-Cry человека с использованием спектроскопии КД. Для выявления изменений во вторичной структуре были записаны спектры КД в дальнем ультрафиолетовом диапазоне (far UV-CD spectra) необработанного белка αA-Cry и его модифицированных форм при концентрации белка, равной 0,2 мг/мл и 1,5 мг/мл, с использованием оптического пути 0,1 и 1 см для дальнего и ближнего УФ-КД-спектров соответственно

рованных в раствор гидрофобных поверхностей этого белка в результате его модификации различными соединениями может играть роль в модуляции его шаперонной функции.

Возможность образования амилоидных фибрилл модифицированным α A-Cry исследовали с помощью флуоресцентного зонда ThT, флуоресценция которого усиливается при его связывании с поперечной β -складчатой структурой в амилоидных фибриллах [66]. Как показано на рис. 2, *f*, флуоресценция ThT увеличивалась в образцах белка, модифицированного MGO, но уменьшалась в образцах, одновременно инкубированных с PON и MGO, в сравнении с немодифицированным белком. Белок α A-Cry, обработанный PON, показывал существенно сниженную флуоресценцию ThT, что указывает на то, что агрегация α A-Cry человека не связана с образованием амилоидных фибрилл.

Анализ вторичной структуры модифицированного аА-Cry с помощью метода КД. Чтобы выявить изменения в структуре белка αA-Cry, в особенности в его вторичной структуре, после его модификации двумя окислительными агентами (PON и MGO), мы изучили спектры КД модифицированного белка в дальнем ультрафиолетовом диапазоне [67]. Спектры КД немодифицированных и PON-модифицированных белков имели минимумы при ~217 нм, что предполагает образование больших количеств β-складчатых структур. Отрицательный пик в спектрах αA-Cry, модифицированного MGO или PON + MGO был сдвинут к 209 нм, что предполагает образование α-спиральной структуры.

Как показано на рис. 3, обработка α A-Сгу метилглиоксалем или смесью PON + MGO приводила к значительным изменениям вторичной структуры белка, особенно в случае MGO-модифицированного белка. Реакция с этими двумя химическими реагентами привела к переходу от β-складчатой к α -спиральной структуре. Другими словами, в белке, модифицированном этими двумя соединениями, ассоциированными с сахарным диабетом, снижено содержание вскладчатой структуры и увеличено количество

α-спиралей (табл. 1). Обработка пероксинитритом также вызывала небольшие изменения вторичной структуры белка.

Изучение структуры белка αA-Cry путём оценки поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение может быть использовано в качестве индекса гидрофобности поверхности, чтобы далее определить структурные изменения в белках [68]. В нашем исследовании мы определили и сравнили значения поверхностного натяжения для необработанного белка αA-Cry и для его модифицированных вариантов. Как показано в табл. 2, поверхностное натяжение модифицированных белков по сравнению с контролем увеличено. Более ранние результаты показали, что количество гидрофобных поверхностей белка, экспонированных в раствор, понижается по мере увеличения поверхностного натяжения белка [43, 69]. Повышенное поверхностное натяжение PON-модифицированного белка соответствовало уменьшению количества гидрофобных поверхностей, подвергшихся воздействию растворителя, на что указывает флуоресценция ANS (рис. 2, *e*).

Поверхностное натяжение белка, обработанного PON + MGO, было ниже поверхностного натяжения α A-Cry, обработанного каждым из этих реагентов по отдельности. Этот вывод свидетельствует о том, что при взаимодействии α A-Cry со смесью двух веществ его гидрофобность немного увеличивалась [70].

Оценка образования хромофоров AGE в модифицированном белке. Окисление может приводить к образованию конечных продуктов гликирования (AGE), которые могут играть важную роль в снижении прозрачности хрусталика глаза [71]. В этом исследовании с помощью флуоресцентной спектрометрии при соответствующих длинах волн было изучено образование соединений AGE при инкубации α A-Cry человека с PON и MGO.

Как показано на рис. 4, реакция белка αA-Cry с MGO приводила к образованию больших количеств новых флуоресцентных хромофоров. Когда PON реагировал с гликированным белком, интенсивность излучения этих хромофоров сильно снижалась, что позволяет предположить, что хромофоры, полученные в результате реакции белка с MGO, были чувствительны к окислению PON.

Для определения этих вновь образующихся хромофоров образцы белка были подвергнуты возбуждению при определённых длинах волн. Мы идентифицировали некоторые соединения AGE, такие как аргпиримидин (возбуждение при 322 и 381 нм, рис. 4, *а* и *b*), пентозидин (возбуждение при 335, 370 и 375 нм, рис. 4, *с*–*е*),

Таблица 2. Поверхностное натяжение различных образцов белка аA-Cry

αA-Cry	Поверхностное натяжение (мН/м)
Контроль PON MGO MGO + PON	$45,4 \pm 1,3 \\ 48,1 \pm 1,6 \\ 50,1 \pm 1,5^* \\ 47,8 \pm 1,3$

* *p* < 0,05

К2Р (возбуждение при 342 нм, рис. 4, f) и карбоксиметиллизин (возбуждение при 352 нм, рис. 4, g), которые образовывались при гликировании α A-Сгу метилглиоксалем [72].

Шаперонная активность модифицированного αА-Сту человека. Агрегация белков хрусталика глаза является одним из основных факторов развития помутнения хрусталика и катаракты, которые можно предотвратить с помощью α-Cry [73-75]. Мы определили шаперонную активность необработанного αA-Cry и его образцов, обработанных различными концентрациями PON и MGO (0,07 и 0,1 мг/ мл), в отношении индуцированной DTT агрегации инсулина при 40 °С путём регистрации поглощения образцов при 360 нм. Как видно на рис. 5, шаперонная активность белка αA-Cry была значительно увеличена после обработки этими реагентами, ассоциированными с СД. Наибольшее повышение шаперонной активности аА-Cry наблюдалось после его инкубации с обоими реагентами.

Вероятно, что инкубация α A-Cry с MGO имела решающее значение для повышения его биологической активности. В целом, полученные нами результаты позволяют предположить, что реакция α A-Cry человека с PON и MGO по отдельности или с их смесью усиливает шаперонную активность этого белка и может обладать защитной функцией против различных типов химических повреждений, ассоциированных с СД. Усиление шаперонной активности α A-Cry носит дозозависимый характер (рис. 5, *b* и *d*).

Рефолдинг и восстановление активности дрожжевой α -глюкозидазы. Мы также оценили влияние α A-Сгу на рефолдинг и восстановление ферментативной активности дрожжевой α -Gls, подвергнутой тепловому и химическому (мочевина) развёртыванию, используя методику, описанную в работе Khoshaman et al. [76]. Как показано на рис. 6, *a*, белок α A-Сгу, обработанный PON, MGO или смесью PON + MGO, немного лучше восстанавливал ферментативную активность α -Gls по сравнению с необработанным шапероном.



Рис. 4. Обнаружение хромофоров АGE в α А-Сгу человека. Возможное образование аргпиримидина (*a* и *b*), пентозидина (*c*, *d* и *e*), К2Р (*f*) и карбоксиметиллизина (*g*) в модифицированном α А-Сгу была изучена с помощью флуоресцентной спектроскопии при длинах волн возбуждения: 322 и 381 нм (*a* и *b*); 335, 370 и 375 нм (*c*, *d* и *e*); 342 нм (*f*) и 352 нм (*g*). Ширина щели при возбуждении/эмиссии была установлена на 10 нм. Концентрация α А-Сгу составляла 0,15 мг/мл

Как видно из рис. 6, a, модифицированный белок α A-Cry лучше предотвращал тепловую инактивацию дрожжевой α -Gls, чем немодифицированный белок. На основании этих резуль-

татов можно предположить, что немодифицированный и модифированный белки αA-Cry будут иметь различную антиагрегационную способность. Однако немодифицированный αA-Cry

восстанавливал активность α -Gls, денатурированной мочевиной, более эффективно, чем модифицированные белки (рис. 6, *b*).

Защитная роль ASA и GSH против структурнофункциональных изменений αА-Сгу человека, модифицированного соединениями, ассоциированными с СД. Аскорбиновая кислота и глутатион являются двумя основными компонентами антиоксидантной системы, которая защищает клетки от окислительного и карбонильного стрессов, и они играют ключевую роль в предотвращении прогрессирования катаракты в тканях хрусталика глаза [77, 78]. Как показано на рис. 7, ASA частично устраняет перекрёстное сшивание αA-Cry



Рис. 5. Шапероноподобная активность α A-Сгу после модификации пероксинитритом и метилглиоксалем. Индуцированную DTT агрегацию бычьего панкреатического инсулина измеряли в присутствии 0,07 мг/мл (*a* и *c*) и 0,1 мг/мл (*b* и *d*) немодифицированного и модифицированного α A-Сгу. Агрегацию инсулина регистрировали при 360 нм в течение 30 мин. *b* и *d* – Шапероноподобная активность α A-Сгу, выраженная в виде процента защиты (%), рассчитанного с использованием уравнения (1). * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001



Рис. 6. Способность модифицированного α A-Cry человека к рефолдингу и восстановлению активности α -Gls. *a* – Термическое разворачивание дрожжевого α -Gls в присутствии и при отсутствии модифицированного и немодифицированного α A-Cry определяли по восстановлению ферментативной активности α -Gls через определенные промежутки времени. *b* – Рефолдинг дрожжевой α -Gls после денатурации мочевиной, инициированный 100-кратным разведением в буфере для рефолдинга в присутствии модифицированного и немодифицированного α A-Cry



Рис. 7. Анализ белка αA-Cry человека с помощью электрофореза в SDS-ПААГ в присутствии ASA и GSH. Препараты немодифицированного и модифицированного белков αA-Cry человека инкубировали с ASA и GSH (10 мM) по отдельности или с их смесью. После окончания инкубации 15 мкг каждого образца белка наносили на 12%-ный гель в присутствии восстановителей. Профили SDS-ПААГ белка, модифицированного PON (*a*), белка, модифицированного MGO (*b*), и белка, модифицированного смесью MGO + PON (*c*). Дорожка 1 – немодифицированный белок. Дорожки 2-4 – белки, модифицированные соответствующим реагентом при отсутствии (дорожка 2) или в присутствии ASA (дорожка 3), GSH (дорожка 4) или смеси ASA и GSH (дорожка 5)

и образованные большие белковые комплексы, возникшие в результате реакции белка с PON и MGO или смесью этих соединений.

GSH в значительной степени предотвращал агрегацию белка αA-Cry и образование HMM. Эффект GSH + ASA был почти таким же, как и у одного GSH, и в значительной степени предотвращал агрегацию модифицированного белка.

Особенности агрегации αA -Сту человека в присутствии PON и MGO. Чтобы изучить влияние модификации белка αA -Сту на его агрегацию и олигомеризацию, мы определили гидродинамические радиусы олигомеров с помощью метода динамического рассеяния света (DLS) [79]. Как показано на рис. 8, *a*, средний размер олигомеров белка αA -Сту (немодифицированный) человека составлял 13,51 нм. Модификация белка пероксинитритом или метилглиокса-

лем или их смесью (рис. 8, b-d соответственно) уменьшала средний гидродинамический радиус олигомеров до 12,71; 11,44 и 10,38 нм соответственно.

Шаперонная активность αA-Cry была обратно пропорциональна распределению его олигомеров по размерам. Иными словами, реакция с ассоциированными с СД соединениями увеличивает шаперонную активность αA-Cry. Уменьшение размера и повышение активности шаперона были особенно значительными для αA-Cry, модифицированного PON и MGO.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Являясь одним из активаторов окислительного и карбонильного стресса, хроническая

(длительная) гипергликемия может неблагоприятно влиять на различные органы, включая хрусталик глаза. Структурные изменения белков хрусталика глаза под воздействием окислительного/карбонильного стрессов приводят к образованию как возрастной, так и диабетической катаракты [80-82]. Сахарный диабет сопровождается усилением химической модификации белков и липидов, скорее всего из-за карбонильного и окислительного стресса, изменяющего функции белков [83]. Карбонильные группы реактивных карбонильных частиц (RCS) могут атаковать аминогруппы в аминокислотах, пептидах или белках с образованием соединений AGE и вызывать карбонильный стресс, за которым следует окислительный стресс и повреждения тканей. Метилглиоксаль, как важный представитель RCS, ассоциирован с гипергликемией как при СД 1-го, так и при СД 2-го типов и связанными с СД осложнениями, такими как нефропатия, болезнь Альцгеймера и катаракта [84, 85]. Следовательно, RCS может способствовать развитию диабета и его осложнений [86]. Кроме того, СД ассоциирован с повышенным окислительным стрессом, который играет важную роль в развитии осложнений и сопровождается образованием PON. Являясь сильным окислителем, PON атакует различные биомолекулы, что приводит к образованию производных аминокислот, таких как нитротирозин, дитирозин и нитротриптофан [87, 88]. Поскольку и MGO, и PON являются высокореактивными модификаторами белков, вырабатываемыми в относительно высоких количествах во время гипергликемии, и способны модифицировать любые белки, их возможное участие в модификации белков хрусталика может привести к сильным структурным и функциональными изменениям этих белков [89].

В нашем предыдущем исследовании было показано, что MGO и PON играют ключевую



Рис. 8. Анализ белка αA-Cry с использованием DLS. Олигомеры немодифицированного белка αA-Cry (*a*); белка, модифицированного PON (*b*); белка, модифицированного MGO (*c*), и белка, модифицированного PON + MGO (*d*), исследовали на гидродинамическое распределение по размерам. Перед проведением измерений образцы белка разводили в 50 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) до концентрации 2 мг/мл. Распределение размеров представлено для относительного объёма. На вставках – относительная интенсивность рассеяния

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

2*

роль в изменении структуры, олигомеризации и агрегации белков хрусталика [22]. В настоящей работе мы показали, что эти два ассоциированных с СД соединения не только сильно меняют вторичную и четвертичную структуры αA-Cry человека (рис. 2, 3, и 8), но также они повышают его шаперонную активность (рис. 5 и 6, a). Другими словами, повреждения структуры белка αА-Сгу, возникшие в результате его реакции с этими двумя соединениями, могут быть в какой-то степени компенсированы повышением шаперонной активности белка. Является ли это защитным механизмом, развившимся в глазных линзах для ослабления/предотвращения молекулярного повреждения, связанного с СД? Вступая в реакцию с αА-кристаллином человека, эти небольшие и высокореактивные молекулы, содержание которых резко возрастает при диабете, могут индуцировать особую конформацию белка с более высокой активностью. В белке αA-Cry имеются несколько пептидных фрагментов, которые играют ключевую роль в его шаперонной активности [90], и реакция этого белка с MGO и PON может приводить к экспонированию этих аминокислотных последовательностей, обеспечивая лучшие условия для взаимодействия белка αA-Cry с белкамиклиентами. Предыдущие исследования показали, что четвертичная структура α -Cry находится в тесной связи с его шаперонной активностью [91]. Этот белок существует в состоянии равновесия в основном между димером и олигомером. Такое равновесие, и в особенности размер олигомеров, играют важную роль в проявлении его шаперонной активности [92]. Во многих исследованиях показано, что уменьшение размеров олигомеров белка αA-Cry приводит к повышению его шаперонной активности [93]. Как показано на рис. 8, реакция PON и MGO с αA-Cry человека уменьшала размер его олигомеров и в то же время увеличивала его шаперонную активность. Эти наблюдения находятся в соответствии с результатами предыдущих работ [94]. Результаты, полученные при анализе картины электрофоретической подвижности (рис. 1), позволяют предположить, что αA-Cry, обработанный MGO, склонен к образованию поперечно-сшитых агрегатов НММ. Ковалентное сшивание этого белка наблюдалось, хотя и в меньшей степени, при инкубации α A-Cry с одним PON или с PON + MGO. Более того, модификация αA-Cry человека с PON и MGO индуцировала образование в структуре белка новых хромофоров (рис. 4). Также PON и MGO вызывали структурные изменения аА-Сту, приводящие к увеличению поверхностного натяжения белка (рис. 2 и 3; табл. 1 и 2). Эти повреждения структуры в значительной степени были снижены в присутствии двух сильных антиоксидантных соединений (GSH и ASA) (рис. 7).

Для поддержания биологической целостности клеток и тканей необходим баланс между производством и катаболизмом оксидантных молекул. По этой причине в тканях глаза имеется мощная система антиоксидантной защиты, предотвращающая повреждения, вызванные избытком метаболитов кислорода. Антиоксидантная защита глазной системы включает в себя ферменты, белки, ASA, GSH, аминокислоты (цистеин и тирозин), мочевую кислоту и др. Недавние исследования указывают на то, что GSH и ASA являются важными антиоксидантами, защищающими белки хрусталика глаза от окислительных агентов, что важно для нормального функционирования эпителия хрусталика [95]. В нашем исследовании GSH продемонстрировал более выраженный эффект в предотвращении структурных повреждений, вызываемых соединениями, ассоциированными с сахарным диабетом (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что два ассоциированных с СД соединения (метилглиоксаль и пероксинитрит) вызывают важные структурные изменения в аА-Сту человека. Эти два высокореакционноспособных соединения могут существенно изменять вторичную, третичную и четвертичную структуры белка. В то же время их химическое взаимодействие с аА-Cry повышает его шаперонную активность. Повышенная шаперонная активность этого белка связана с уменьшением размера его олигомеров. Антиоксидантные соединения (GSH и ASA) оказались способны обращать структурные изменения в белке α A-Cry. Вероятно, что повышение шаперонной активности аA-Cry человека связано с его неполным окислением. Повышение шаперонной активности этого белка при окислении может играть важную роль в преодолении деструктивных эффектов окислительного стресса в хрусталике глаза больных сахарным диабетом.

Финансирование. Проведение настоящей работы было поддержано Ученым советом университета Шираза, Научным фондом Ирана (INSF) (проекты 9914455 и 9610387), Национальным институтом медицинских исследований (NIMAD) (проект 964854) и Министерством на-

уки и высшего образования Российской Федерации (Б.И.К).

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

- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., and Grune, T. (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus, *Biomolecules*, 5, 194-222, doi: 10.3390/biom5010194.
- Semchyshyn, H. M. (2014) Reactive carbonyl species in vivo: Generation and dual biological effects, Sci. World J., 2014, 1-10, doi: 10.1155/2014/417842.
- Vander Jagt, D. L. (2008) Methylglyoxal, diabetes mellitus and diabetic complications, *Drug Metabol. Drug Interact.*, 23, 93-124, doi: 10.1515/dmdi.2008.23.1-2.93.
- Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol. Rev.*, 87, 315-424, doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
- Sasaki, K., Sasaki, H., Jonasson, F., Kojima, M., and Cheng, H. M. (2004) Racial differences of lens transparency properties with aging and prevalence of age-related cataract applying the WHO classification system, *Ophthalmic. Res.*, 36, 332-340, doi: 10.1159/000081636.
- Linetsky, M., Shipova, E., Cheng, R., and Ortwerth, B. J. (2008) Glycation by ascorbic acid oxidation products leads to the aggregation of lens proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 22-34.
- Kiziltoprak, H., Tekin, K., Inanc, M., and Sakir Goker, Y. (2019) Cataract in diabetes mellitus, *World J. Diabetes*, 10, 140-153.
- Šimunović, M., Paradžik, M., Škrabić, R., Unić, I., Bućan, K., et al. (2018) Cataract as early ocular complication in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, *Int. J. Endocrinol.*, **2018**, 1-6, doi: 10.1155/ 2018/6763586.
- 9. Benedek, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye, *Appl. Opt.*, **10**, 459-473, doi: 10.1364/AO.10.000459.
- Delaye, M., and Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency, *Nature*, **302**, 415-417, doi: 10.1038/302415a0.
- Bhat, S. P., and Nagineni, C. N. (1989) Alpha B subunit of lens-specific protein alpha crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 319-325, doi: 10.1016/s0006-291x(89)80215-3.
- Robman, L., and Taylor, H. (2005) External factors in the development of cataract, *Eye (Lond)*, **19**, 1074-1082, doi: 10.1038/sj.eye.6701964.
- 13. Ma, Z., Hanson, S. R., Lampi, K. J., David, L. L., and Smith, J. B. (1998) Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry, *Exp. Eye Res.*, **67**, 21-30, doi: 10.1006/exer.1998.0482.
- Fu, L., and Liang, J. J. (2003) Alteration of protein-protein interactions of congenital cataract crystallin mutants, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44, 1155-1159, doi: 10.1167/iovs.02-0950.
- Reddy, V. S., Kumar, C. U., and Reddy, G. B. (2014) Effect of chronic hyperglycemia on crystallin levels in rat lens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 446, 602-607, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.012.
- Wang, Y., and Ho, C.-T. (2012) Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 4140-4149, doi: 10.1039/c2cs35025d.
- Alvarez, B., and Radi, R. (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins, *Amino Acids*, 25, 295-311, doi: 10.1007/s00726-003-0018-8.

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clin. Chim. Acta*, **329**, 23-38, doi: 10.1016/s0009-8981(03)00003-2.
- Dayanand, C. D., Pradeep, K. V., and Kutty, A. V. (2012) Protein carbonyl content as a stable oxidative stress marker in type II diabetes, *Int. J. Biol. Med. Res.*, 3, 2362-2365.
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Khoshaman, K., Sasan Moghadam, S., and Kurganov, B. I. (2016) Evaluation of structure, chaperone-like activity and protective ability of peroxynitrite modified human α-crystallin subunits against copper-mediated ascorbic acid oxidation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **87**, 208-221, doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2016.02.040.
- Chang, W., Wang, R., and Wu, L. (2005) Methylglyoxalinduced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 38, 286-293, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.034.
- Moghadam, S., Oryan, A., Kurganov, B. I., Tamaddon, A. M., Alavianehr, M. M., et al. (2017) The structural damages of lens crystallins induced by peroxynitrite and methylglyoxal, two causative players in diabetic complications and preventive role of lens antioxidant components, *Int. J. Biol. Macromol.*, **103**, 74-88, doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2017.04.090.
- 23. Chen, Y., Mehta, G., and Vasiliou, V. (2014) Antioxidant defenses in the ocular surface, *Ocul. Surf.*, **7**, 176-185, doi: 10.1016/s1542-0124(12)70185-4.
- 24. Merck, K. B., Groenen, P. J., Voorter, C. E., de Haard-Hoekman, W. A., Horwitz, J., et al. (1993) Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1046-1052.
- 25. Biswas, A., and Das, K. P. (2004) Role of ATP on the interaction of α -crystallin with its substrates and its implications for the molecular chaperone function, *J. Biol. Chem.*, **279**, 42648-42657, doi: 10.1074/jbc.M404444200.
- 26. Nagaraj, R. H., Panda, A. K., Shanthakumar, S., Santhoshkumar, P., Pasupuleti, N., et al. (2012) Hydroimidazolone modification of the conserved Arg12 in small heat shock proteins: studies on the structure and chaperone function using mutant mimics, *PLoS One*, 7, 1-10, doi: 10.1371/journal.pone.0030257.
- Robinson, K. M., and Beckman, J. S. (2005) Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide, *Methods Enzymol.*, **396**, 207-214, doi: 10.1016/S0076-6879(05)96019-9.
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Khoshaman, K., and Alavianmehr, M. M. (2015) The impact of calcium ion on structure and aggregation propensity of peroxynitrite-modified lens crystallins: new insights into the pathogenesis of cataract disorders, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 125, 170-180, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.002.
- Ischiropoulos, H., and Al-Mehdi, A. B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications, *FEBS Lett.*, 364, 279-282, doi: 10.1016/0014-5793(95)00307-u.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., et al. (1996) Peroxynitrite dependent tryptophan nitration, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 390-396, doi: 10.1021/ tx950133b.

- Kumar, P. A., Kumar, M. S., and Reddy, G. B. (2007) Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function, *Biochem. J.*, 408, 251-258, doi: 10.1042/BJ20070989.
- Al-Hilaly, Y. K., Williams, T. L., Stewart-Parker, M., Ford, L., Skaria, E., et al. (2013) A central role for dityrosine crosslinking of amyloid-β in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol. Commun.*, 1, 83, doi: 10.1186/2051-5960-1-83.
- 33. Hospes, M., Hendriks, J., and Hellingwerf, K. J. (2013) Tryptophan fluorescence as a reporter for structural changes in photoactive yellow protein elicited by photoactivation, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **12**, 479-488, doi: 10.1039/c2pp25222h.
- Heinecke, J. W., Li, W., Daehnke, H. L. 3rd, and Goldstein, J. A. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages, *J. Biol. Chem.*, 268, 4069-4077.
- Paoli, P. Sbrana, F., Tiribilli, B., Caselli, A., Pantera, B., et al. (2010) Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils, *J. Mol. Biol.*, **400**, 889-907, doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.039.
 Meehan, S., Knowles, T. P., Baldwin, A. J., Smith, J. F.,
- 36. Meehan, S., Knowles, T. P., Baldwin, A. J., Smith, J. F., Squires, A. M., et al. (2007) Characterisation of amyloid fibril formation by small heat-shock chaperone proteins human αA -, αB - and R120G αB -crystallins, *J. Mol. Biol.*, **372**, 470-484, doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.060.
- Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.*, 32, W668-W673, doi: 10.1093/nar/gkh371.
- Gakamsky, A., Duncan, R. R., Howarth, N. M., Dhillon, B., Buttenschön, K. K., et al. (2017) Tryptophan and non-tryptophan fluorescence of the eye lens proteins provides diagnostics of cataract at the molecular level, *Sci. Rep.*, 7, 40375, doi: 10.1038/srep40375.
- Kessel, L., Kalinin, S., Nagaraj, R. H., Larsen, M., and Johansson, L. B. (2002) Time-resolved and steady-state fluorescence spectroscopic studies of the human lens with comparison to argpyrimidine, pentosidine and 3-OHkynurenine, *Photochem. Photobiol.*, **76**, 549-554, doi: 10.1562/0031-8655(2002)076<0549:trassf>2.0.co;2.
- Coussons, P. J., Jacoby, J., Mckay, A., Kelly, S. M., Price, N. C., et al. (1997) Glucose modification of human serum albumin: A structural study, *Free Radic. Bio. Med.*, 22, 1217-1227, doi: 10.1016/s0891-5849(96)00557-6.
- Munch, G., Keis, R., Wessels, A., Riederer, P., Bahner, U., et al. (1997) Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35, 669-677, doi: 10.1515/cclm.1997.35.9.669.
- Cheng, R., Feng, Q., Argirov, O. K., and Ortwerth, B. J. (2005) K2P – a novel cross-link from human lens protein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1043**, 184-194, doi: 10.1196/annals. 1333.023.
- Alavi, P., Yousefi, R., Amirghofran, S., Karbalaei-Heidari, H. R., and Moosavi-Movahedi, A. A. (2013) Structural analysis and aggregation propensity of reduced and nonreduced glycated insulin adducts, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **170**, 623-638, doi: 10.1007/s12010-013-0207-1.
- Zhou, C., Qi, W., Lewis, E. N., and Carpenter, J. F. (2015) Concomitant Raman spectroscopy and dynamic light scattering for characterization of therapeutic proteins at high concentrations, *Anal. Biochem.*, **472**, 7-20, doi: 10.1016/ j.ab.2014.11.016.
- 45. Bumagina, Z., Gurvits, B., Artemova, N., Muranov, K., and Kurganov, B. I. (2010) Paradoxical acceleration of dithiothreitol-induced aggregation of insulin in the pres-

ence of a chaperone, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 4556-4579, doi: 10.3390/ijms11114556.

- Kurganov, B. I. (2002) Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Biochemistry (Moscow)*, 67, 409-422, doi: 10.1023/ a:1015277805345.
- Biswas, A., and Das, K. P. (2007) Alpha-crystallin assisted refolding of enzyme substrates: Optimization of external parameters, *Protein J.*, 4, 247-255, doi: 10.1007/s10930-006-9066-8.
- Khoshaman, K., Yousefi, R., Niazi, A., Oryan, A., Moosavi-Movahedi, A. A., et al. (2018) Importance of the positively charged residue at position 54 to the chaperoning function, conformational stability and amyloidogenic nature of human αA-crystallin, *J. Biochem.*, **163**, 187-199, doi: 10.1093/jb/mvx071.
- 49. Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1517-1520.
- 50. Weber, K., and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379, doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
- 52. Porter, R. R. (1953) Partition chromatography of insulin and other proteins, *Biochem. J.*, **53**, 320-328, doi: 10.1042/bj0530320.
- 53. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein. Sci.*, **4**, 2411-2423, doi: 10.1002/pro.5560041120.
- Scientist for Experimental Data Fitting (1995) Microsoft Windows Version 2.0. Salt Lake City: Micro Math, Inc.
- Moreau, K. L., and King, J. A. (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention, *Trends Mol. Med.*, 18, 273-282, doi: 10.1016/ j.molmed.2012.03.005.
- Argirova, M., and Breipohl, W. (2002) Comparison between modifications of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid, and fructose, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 16, 140-145, doi: 10.1002/ jbt.10031.
- 57. Thiagarajan, G., Lakshmanan, J., Chalasani, M., and Balasubramanian, D. (2004) Peroxynitrite reaction with eye lens proteins: α -crystallin retains its activity despite modification, *Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 2115-2121, doi: 10.1167/iovs.03-0929.
- Cubillos-Rojas, M., Schneider, T., Sánchez-Tena, S., Bartrons, R., Ventura, F., et al. (2016) Analysis of protein oligomerization by electrophoresis, *Methods Mol. Biol.*, 1449, 341-348, doi: 10.1007/978-1-4939-3756-1_22.
- Nowak, P., Zbikowska, H. M., Ponczek, M., Kolodziejczyk, J., and Wachowicz, B. (2007) Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: Functional consequences, *Thromb. Res.*, **121**, 163-174, doi: 10.1016/ j.thromres.2007.03.017.
- Akhand, A. A., Hossain, K., Cato, M., Miyata, T., Du, J., et al. (2001) Glyoxal and methylglyoxal induce lyoxal and methyglyoxal induce aggergation and inactivation of ERK in human endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1228-1235, doi: 10.1016/s0891-5849(01)00702-x.
- 61. Bray, M. R., and Clarke, A. J. (1995) Identification of an essential tyrosyl residue in the binding site of

Schizophyllum commune xylanase A, *Biochemistry*, **34**, 2006-2014, doi: 10.1021/bi00006a022.

- Ye, Y., Quijano, C., Robinson, K. M., Ricart, K. C., Strayer, A. L., et al. (2007) Prevention of peroxynitriteinduced apoptosis of motor neurons and pc12 cells by tyrosine-containing peptides, *J. Biol. Chem.*, 282, 6324-6337, doi: 10.1074/jbc.M610800200.
- Annibal, A., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fedorova, M., et al. (2016) Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1019, 147-155, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.12.022.
- Maina, M. B., Al-Hilaly, Y. K., Burra, G., Rickard, J., Harrington, C., et al. (2021) Oxidative stress conditions result in trapping of PHF-core tau (297-391) intermediates, *Cells*, 10, 703, doi: 10.3390/cells10030703.
- 65. Hawe, A., Sutter, M., and Jiskoot, W. (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Pharm. Res.*, **25**, 1487-1499, doi: 10.1007/s11095-007-9516-9.
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., and Guo, Z. (2017) Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation, *R. Soc. Open. Sci.*, 4, 1-12, doi: 10.1098/rsos.160696.
- Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.*, 1, 2876-2890, doi: 10.1038/nprot.2006.202.
- Schor, M., Reid, J. L., MacPhee, C. E., and Stanley-Wall, N. R. (2016) The diverse structures and functions of surfactant proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 610-620, doi: 10.1016/j.tibs.2016.04.009.
- Sattarahmady, N., Moosavi-Movahedi, A. A., and Habibi-Rezaei, M. (2011) A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated *in vivo* and *in vitro*, *J. Med. Biochem.*, **30**, 5-10, doi: 10.2478/v10011-010-0026-7.
- Yousefi, R., Javadi, S., Amirghofran, S., Oryan, A., and Moosavi-Movahedi, A. A. (2016) Assessment of structure, stability and aggregation of soluble lens proteins and alphacrystallin upon non-enzymatic glycation: The pathomechanisms underlying cataract development in diabetic patients, *Int. J. Biol. Macromol.*, 82, 328-338, doi: 10.1016/ j.ijbiomac.2015.10.036.
- Ho, M.-C., Peng Y.-J., Chen, S.-J., and Chiou, S.-H. (2010) Senile cataracts and oxidative stress, *J. Clin. Gerontol. Geriatr.*, 1, 17-21, doi: 10.1016/j.jcgg.2010. 10.006.
- Javadi, S., Yousefi, R., Hosseinkhani, S., Tamaddon, A. M., and Uversky, V. N. (2017) Protective effects of carnosine on dehydroascorbate-induced structural alteration and opacity of lens crystallins: Important implications of carnosine pleiotropic functions to combat cataractogenesis, J. Biomol. Struct. Dyn., 35, 1766-1784, doi: 10.1080/07391102.2016.1194230.
- Das, K. P., and Surewicz, W. K. (1995) On the substrate specificity of α-crystallin as a molecular chaperone, *Biochem. J.*, **311**, 367-370, doi: 10.1042/bj3110367.
- Hook, D. W. A., and Harding, J. J. (1998) Protection of enzymes by α-crystallin acting as a molecular chaperone, *Int. J. Biol. Macromol.*, 22, 295-306, doi: 10.1016/s0141-8130(98)00027-0.
- Reddy, G. B., Das, K. P., Petrash, J. M., and Surewicz, W. K. (2000) Temperature-dependent chaperone activity and structural properties of human alphaA- and alphaBcrystallins, *J. Biol. Chem.*, **275**, 4565-4570, doi: 10.1074/jbc.275.7.4565.
- 76. Khoshaman, K., Yousefi, R., Tamaddon, A. M., Abolmaali, S. S., Oryan, A., et al. (2017) The impact of different mutations at Arg54 on structure, chaperone-like activity and oligomerization state of human α A-crystallin: The pathomechanism underlying congenital cataract-

causing mutations R54L, R54P and R54C, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 604-618, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.02.003.

- Kisic, B., Miric, D., Zoric, L., Ilic, A., and Dragojevic, I. (2012) Antioxidant capacity of lenses with age-related cataract, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 467130, doi: 10.1155/2012/467130.
- Donma, O., Yorulmaz, E. Ö., Pekel, H., and Suyugül, N. (2002) Blood and lens lipid peroxidation and antioxidant status in normal individuals, senile and diabetic cataractous patients, *Curr. Eye Res.*, 25, 9-16, doi: 10.1076/ ceyr.25.1.9.9960.
- Amin, S., Barnett, G., Pathak, J., Roberts, C., and Sarangpani, P. (2014) Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **19**, 438-449, doi: 10.1016/j.cocis.2014. 10.002.
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., and Jaggi, A. S. (2014) Advanced glycation end products and diabetic complications, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 18, 1-14, doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
- Gul, A., Rahman, M. A., Hasnain, S. N., Salim, A., and Simjee, S. U. (2008) Could oxidative stress associate with age products in cataractogenesis? *Curr. Eye Res.*, 33, 669-675, doi: 10.1080/02713680802250939.
- Beswick, H. T., and Harding, J. J. (1987) Conformational changes induced in lens alpha- and gamma-crystallins by modification with glucose 6-phosphate. Implications for cataract, *Biochem. J.*, **246**, 761-769, doi: 10.1042/ bj2460761.
- 83. Baynes, J. W., and Thorpe, S. R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, **48**, 1-9, doi: 10.2337/diabetes. 48.1.1.
- Bizzozero, O. A. (2009) Protein carbonylation in neurodegenerative and demyelinating CNS diseases, *Handbook Neurochem. Mol. Neurobiol.*, 543-562, doi: 10.1007/978-0-387-30375-8_23.
- Luthra, M., and Balasubramanian, D. (1993) Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins, *J. Biol. Chem.*, 268, 18119-18127.
- Asmat, U., Abad, K., and Ismail, K. (2015) Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review, *Saudi Pharm. J.*, 24, 547-553, doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013.
- Bartesaghi, S., and Radi, R. (2018) Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration, *Redox Biol.*, 14, 618-625, doi: 10.1016/j.redox. 2017.09.009.
- Nuriel, T., Hansler, A., and Gross, S. S. (2011) Protein nitrotryptophan: formation, significance and identification, *J. Proteomics*, **74**, 2300-2312, doi: 10.1016/j.jprot. 2011.05.032.
- Nagai, R., Unno, Y., Hayashi, M. C., Masuda, S., Hayase, F., et al. (2002) Peroxynitrite induces formation of N^e-(carboxymethyl) lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose, *Diabetes*, **51**, 2833-2839, doi: 10.2337/diabetes. 51.9.2833.
- Kumar, M. S., Mrudula, T., Mitra, N., and Reddy, G. B. (2004) Enhanced degradation and decreased stability of eye lens alpha-crystallin upon methylglyoxal modification, *Exp. Eye Res.*, **79**, 577-583, doi: 10.1016/j.exer.2004. 07.003.
- 91. Raman, B., and Rao, C. M. (1994) Chaperone-like activity and quaternary structure of alpha-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27264-27268.
- 92. Boelens, W. C. (2020) Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activi-

ties, Cell Stress Chaperones, 25, 581-591, doi: 10.1007/s12192-020-01093-1.

- Nagaraj, R. H., Nahomi, R. B., Mueller, N. H., Raghavan, C. T., Ammar, D. A., et al. (2016) Therapeutic potential of α-crystallin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 252-257, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.03.012.
- Sharma, K. K., and Santhoshkumar, P. (2009) Lens aging: Effects of crystallins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1095-1108, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.008.
- 95. Cabrera, M. P., and Chihuailaf, R. H. (2011) Antioxidants and the integrity of ocular tissues, *Vet. Med. Int.*, **2011**, 905153, doi: 10.4061/2011/905153.

RELATIONSHIP BETWEEN THE STRUCTURE AND CHAPERONE ACTIVITY OF HUMAN αA-CRYSTALLIN AFTER ITS MODIFICATION WITH DIABETES-ASSOCIATED OXIDATIVE AGENTS AND PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS

S. S. Moghadam¹, M. Ghahramani¹, K. Khoshaman¹, A. Oryan², A. A. Moosavi-Movahedi³, B. I. Kurganov⁴, and R. Yousefi^{1,3*}

 ¹ Protein Chemistry Laboratory, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran; e-mail: ryousefi@shirazu.ac.ir; r.yousefi2000@gmail.com
 ² Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

³ Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

The study was aimed to evaluate the impact of peroxynitrite (PON, oxidative stress agent in diabetes), methylglyoxal (MGO, diabetes-associated reactive carbonyl compound), and their simultaneous application on the structural and functional features of human α A-crystallin (α A-Cry) using various spectroscopy techniques. Additionally, the surface tension and oligomer size distribution of the treated and untreated protein were tested using tensiometric analysis and dynamic light scattering, respectively. Our results indicated that the reaction of PON and MGO with human α A-Cry leads to the formation of new chromophores, alterations in the secondary to quaternary protein structure, reduction in the size of protein oligomers, and significant enhancement in the chaperone activity of α A-Cry. To reverse the effects of the tested compounds, ascorbic acid and glutathione (main components of lens antioxidant defense system) were applied. As expected, the two antioxidant compounds significantly prevented formation of high molecular weight aggregates of α A-Cry (according to SDS-PAGE). Our results suggest that the lens antioxidant defense system, in particular, glutathione, may provide a strong protection against rapid incidence and progression of diabetic cataract by preventing the destructive reactions of highly reactive DM-associated metabolites.

Keywords: human aA-crystallin, diabetic cataract, lens antioxidant, protein structure, chaperone activity

УДК 577.112.7;617.741

БИОХИМИЯ ХРУСТАЛИКА ГЛАЗА: НОРМА И КАТАРАКТОГЕНЕЗ Обзор

© 2022 К.О. Муранов*, М.А. Островский

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: k.muranov@sky.chph.ras.ru

> Поступила в редакцию 28.07.2021 После доработки 30.09.2021 Принята к публикации 30.09.2021

В обзоре рассматриваются структурно-функциональные особенности строения хрусталика, с одной стороны, обеспечивающие его исключительные оптические свойства, а с другой – приводящие к возникновению катаракты. Отсутствие клеточных органелл в волоконных клетках, высокая концентрация белка (до 900 мг/мл) в цитоплазме минимизируют светорассеяние в хрусталике и обеспечивают его прозрачность. Низкая концентрация кислорода, мощные системы защиты (антиоксиданты, антиоксидантные ферменты, шапероноподобный белок α-кристаллин и др.) поддерживают прозрачность хрусталика в течение жизни организма. С другой стороны, способность кристаллинов накапливать с возрастом посттрансляционные модификации, снижающие устойчивость белков к окислительному стрессу, является важнейшим фактором, способствующим образованию катаракты. На основе анализа морфологических и биохимических данных о возникновении и развитии катаракт разной этиологии (возрастная, радиационная, ультрафиолетовая, диабетическая и др.) авторы высказывают гипотезу о едином механизме, лежащем в основе возникновения помутнения хрусталика. Указанные катарактогенные факторы вызывают повреждение и гибель клеток хрусталикового эпителия, в результате чего кислород через образовавшиеся дефекты эпителиального слоя проникает в хрусталик. Это вызывает окислительное повреждение кристаллинов. Белки вследствие этого денатурируют, агрегируют и образуют так называемые мультиламеллярные тела, что и является главной причиной помутнения. В обзоре рассматриваются различные подходы к торможению развития помутнения (катаракты), в частности, использование комбинации антиоксидантов и соединений, усиливающих шапероноподобные свойства α-кристаллина. Обсуждается парадокс применения антикатарактальных препаратов, которые в лабораторных исследованиях демонстрируют высокую эффективность, но при широком использовании в клинике оказываются бесполезны. Такой парадокс – результат позднего применения препаратов. По мнению авторов обзора, выход из создавшегося положения состоит не столько в поиске более активных антикатарактальных соединений, сколько в развитии новых методов диагностики, которые позволили бы прогнозировать риск возникновения катаракты у пациента и начинать профилактическое лечение задолго до проявления клинических признаков заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хрусталик, катаракта, патогенез, кристаллины, малые белки теплового шока, анти-катарактальные средства.

DOI: 10.31857/S0320972522020038

Посвящается памяти Бориса Ивановича Курганова

введение

Целостный взгляд на хрусталик открывает удивительно логичное построение этого органа. Выполнение основной физиологической функции хрусталика как фокусирующей линзы требует прозрачности ткани хрусталика. Достигается это с помощью исключительно высокой концентрации белка в цитоплазме волоконных клеток хрусталика. Действительно, во-первых, при концентрациях белка порядка 400–900 мг/мл

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, а.о. – аминокислотные остатки.

коэффициент преломления цитоплазмы сравним с коэффициентом преломления плазматической мембраны клетки, что исключает светорассеяние на мембранах. Во-вторых, за счёт кулоновских взаимодействий в цитоплазме волоконных клеток хрусталика минимизируются флуктуации концентрации белка, а именно флуктуации концентрации, на границе которых существует значительный градиент коэффициента преломления среды, представляют собой физическую основу светорассеяния коллоидных растворов.

Отсутствие возможности в изолированной ткани хрусталика удалять поврежденные структуры (клетки, молекулы белка и др.) предопре-

^{*} Адресат для корреспонденции.

деляет необходимость существования в хрусталике системы поддержания структурной стабильности белковых молекул. Примером может служить α-кристаллин — шапероноподобный белок, предупреждающий агрегацию дестабилизированных молекул.

Следуя этой логической цепочке, в настоящем обзоре мы постараемся рассмотреть и связать воедино многочисленные экспериментальные данные, касающиеся как механизмов, обеспечивающих прозрачность хрусталика, так и механизмов, лежащих в основе её потери (катарактогенез) и указывающих пути предотвращения потери прозрачности хрусталика.

СТРОЕНИЕ И МОРФОГЕНЕЗ ХРУСТАЛИКА

Главным элементом глаза, фокусирующим изображение на сетчатке, является хрусталик. Хрусталик «подвешен» с помощью цинновой связки непосредственно за радужной оболоч-кой, которая разделяет глаз на переднюю и зад-нюю камеры. Образование хрусталика начинается на ранних стадиях эмбрионального развития (рис. 1).

На 11 день внутриутробного развития мыши хорошо различим пузырёк отделившейся эктодермы (рис. 1, *a*), который уплощается и образует двухслойный зачаток хрусталика (рис. 1, δ). Под воздействием ростовых факторов сетчатки примыкающие к ней клетки зачатка хрусталика начинают вытягиваться и образуют слой длинных волоконных клеток (рис. 1, *в*1). В результате



Рис. 1. Схема формирования хрусталика. (Объяснения – в тексте)

образуется первичное ядро хрусталика. Клетки слоя, отдалённого от сетчатки, превращаются в клетки кубического эпителия. По периферии передней поверхности хрусталика клетки эпителия, образующие замкнутый круг, начинают активно делиться. Постепенно они сдвигаются к экватору хрусталика, образуя меридиональные ряды (рис. 1, в2). Клетки, находящиеся в экваториальной зоне хрусталика, вытягиваются и образуют вторичные волоконные клетки (рис. 1, г). В процессе формирования волоконные клетки теряют органеллы (ядра, митохондрии и др.) и в конечном итоге превращаются практически в «мешки» с цитоплазмой. Постепенно образуются всё новые и новые волокна, которые окружают ядро хрусталика всё новыми и новыми слоями (рис. 1, ∂). Волоконные клетки настолько плотно прилегают друг к другу, что в сечении имеют форму равностороннего шестиугольника. Таким образом, в хрусталике формируются три зоны: 1) слой кубического эпителия, выстилающий изнутри переднюю поверхность капсулы хрусталика, 2) кортикальный слой, образованный формирующимися волоконными клетками и 3) ядро, состоящее из терминально дифференцированных волоконных клеток. Клетки выделяют гликопротеины, которые образуют капсулу снаружи хрусталика. Активные метаболические процессы, сопровождающие формирование хрусталика, требуют интенсивного обмена веществ. Такой обмен обеспечивается сосудистой оболочкой, которой окружён хрусталик в ходе внутриутробного развития. Впоследствии питающая хрусталик кровеносная система рассасывается.

Форма и размер хрусталика у животных разных видов широко варьируют и не коррелируют ни с размером самого животного, ни с диаметром глазного яблока. Вариации формы и размера хрусталика у животных разных видов можно рассматривать как адаптацию к среде обитания. Например, хрусталик крысы близок по форме к сфере, коэффициент его преломления в районе главной оптической оси равен коэффициенту преломления чистого белка (1,45), то есть раствору белка с содержанием воды, стремящимся к нулю. Поэтому хрусталик крысы очень твёрд и практически не обладает способностью к аккомодации. Действительно, грызунам не требуется «рассматривать» предметы вдали, а в их ориентации в пространстве ведущую роль играют осязание и обоняние. У приматов, в том числе и у человека, зрение, напротив, играет ведущую роль во взаимодействии со средой. Поэтому хрусталик у них способен фокусировать на сетчатке изображения объектов с разных расстояний и практически

без аберраций. Это достигается тем, что в ядре хрусталика, через которое проходит основной световой поток, отсутствует градиент коэффициента преломления [1-3].

ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ ХРУСТАЛИКА

Хрусталик в глазу выполняет две основные физиологические функции: фокусирование изображения на сетчатке и световую фильтрацию. У млекопитающих ведущую роль в аккомодации играет изменение кривизны поверхности хрусталика, тогда как у рептилий и у птиц изменяется кривизна и хрусталика, и роговицы [4]. Структура и организация волоконных клеток являются ключевыми компонентами механизма аккомодации, поскольку от них зависят упругие свойства хрусталика, обеспечивающие его «округление» [5–8]. Поскольку с возрастом количество слоёв волоконных клеток увеличивается, жёсткость хрусталика возрастает. Следствием этого становится неспособность хрусталика изменять кривизну за счёт своих упругих свойств - возникает старческая дальнозоркость.

Хрусталики многих животных содержат хромофоры, поглощающие свет в области 300-400 нм. Хромофорами служат соединения различных химических групп. Так, у рыб – это микоспорино-подобные аминокислоты [9], у дневного геккона (Lygodactylus picturatus) – это 3,4-дигидроретинол [10]; у приматов, серых белок (Spermophilus tridecemlineatus) и рыбок гурами (Trichogaster) в качестве УФ-фильтров используются производные триптофана [11–13]. Надо отметить, что хрусталики лабораторных животных (крысы, кролики, мыши), крупного рогатого скота и домашних кур вообще не содержат УФ-фильтров. Можно считать доказанным, что у дневных сухопутных животных окрашенный хрусталик выполняет роль светофильтра, защищающего сетчатку от опасности повреждающего действия ультрафиолетового и сине-фиолетового света [14-17].

На основе этих сведений в середине 80-х гг. прошлого века были созданы интраокулярные линзы «Спектр», имеющие желтоватую окраску хрусталика человека 45—50-летнего возраста [18]. Анализ отдалённых результатов имплантаций более 1 300 000 таких хрусталиков показал, что они надежно защищают сетчатку и пигментный эпителий от опасности фотоповреждения и заметно улучшают качество зрительного восприятия [19].

Пожелтение хрусталика у человека является результатом фотохимических превращений триптофана с образованием кинуренина, 3-OH-

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

кинуренина и 3-ОН-кинуренин-О-гликозида. Наличие хромофоров в хрусталике, которые могли бы вызывать фотохимическое повреждение белков хрусталика, компенсируется коротким временем жизни возбуждённых состояний молекул хромофоров и низким уровнем кислорода (2 мм рт. ст.) в ткани хрусталика [20]. Концентрация в хрусталике 3-ОН-кинуренин-Огликозида с возрастом падает, происходит его связывание с белками - образуются так называемые желтые белки, у которых резко снижена способность рассеивать поглощённую световую энергию и увеличена способность индуцировать образование активных форм кислорода (AΦK) [21].

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ХРУСТАЛИКА

Первые биохимические исследования хрусталика, упомянутые в литературе, относятся к концу XIX века, когда Морнером был выделен растворимый белок хрусталика, названный кристаллином (цитируется по [22]). В 50-х гг. прошлого века сначала Орехович с сотр. [23], а потом Resnik [24] выделили из растворимых фракций белков хрусталика три фракции разного молекулярного веса, которые были названы α-, β- и γ-кристаллинами.

Хрусталик содержит около 35% белков, 1% липидов и 64% воды. Белки хрусталика принято разделять на водорастворимые и водоне-



Рис. 2. Профиль элюции растворимых белков кортекса и ядра хрусталика крупного рогатого скота (колонка $2,5 \times 90$ см, Toyopearl HW55 fine). Синяя пунктирная линия – кортекс, голубая непрерывная линия – ядро. $\alpha_{\rm H}$ -Кристаллин > 1500 кДа, α -кристаллин – 700 кДа, $\beta_{\rm H}$ -кристаллин – 160 кДа, $\beta_{\rm L}$ -кристаллин – 46 кДа, γ -кристаллин – 20 кДа

растворимые [25]. Более 90% растворимых белков хрусталика приходится на долю α -, β - и γ -кристаллинов [26]. Хрусталик имеет неоднородный белковый состав. В ядре преобладают фракции высокомолекулярных форм α -, β -кристаллинов и γ -кристаллина, тогда как в кортексе основными белками являются α - и β_1 -кристаллины (рис. 2).

 α -Кристаллин принадлежит к семейству малых белков теплового шока, в то время как β - и γ -кристаллины входят в суперсемейство, родственное стрессовым белкам прокариот [27]. Соотношение α -, β - и γ -кристаллинов в тканях хрусталика меняется с возрастом, что обусловлено особенностями синтеза разных типов белков в онтогенезе [28]. Кроме кристаллинов, клетки хрусталика содержат белки цитоскелета, мембранные белки и цитоплазматические ферменты. Однако именно кристаллины играют ключевую роль в обеспечении оптических свойств хрусталика.

 α -Кристаллин — олигомерный белок с молекулярной массой 160—1000 кДа; он образован двумя полипептидами — α А- и α В-кристаллинами массой около 20 кДа. Как и другие малые белки теплового шока, α -кристаллин обладает способностью блокировать агрегацию дестабилизированных белков и играет важную роль в поддержании прозрачности хрусталика. Более подробно особенности строения и функции α кристаллина будут обсуждены ниже.

β-Кристаллины – структурные белки, преобладающие по содержанию в хрусталике (до 60% всех кристаллинов). Это комплексная группа олигомерных белков. Различают две основные подгруппы, а именно βА- (кислые) и βВ- (щелочные) кристаллины, каждая из которых представлена четырьмя изоформами, обозначаемыми арабскими цифрами 1–4. Субъединицы β-кристаллинов комбинируются в разных сочетаниях с образованием гомо- и гетероолигомеров.

γ-Кристаллины, имеющие молекулярную массу около 20 кДа, представлены семью изоформами и обозначаются латинскими буквами A—F, а также буквой S. γ-Кристаллины существуют только в виде мономеров [29, 30].

Молекулы β/γ -кристаллинов имеют двухдоменную структуру. Каждый из доменов содержит по два гомологичных мотива «греческого ключа», составленного из четырёх антипараллельных β -структур, образующих клиновидный β -сэндвич с двусторонней симметрией. В отличие от γ -кристаллинов β -кристаллины имеют удлинённые *N*-концевые и *C*-концевые последовательности — «руки», которые играют важную роль в олигомеризации β -кристаллинов [31]. При исследовании экспрессии генов, кодирующих все известные 17 кристаллинов, показано, что активность экспрессии генов сильно варьирует в зависимости от степени дифференцировки и, соответственно, локализации волоконной клетки [28].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПРОЗРАЧНОСТИ ХРУСТАЛИКА

Первые попытки подойти к вопросу о молекулярных основах прозрачности хрусталика были предприняты в 1962 г. Troekel [22]. Позднее Benedek [32] разработал теоретические основы прозрачности хрусталика. Минимальное светорассеяние концентрированного раствора белка, которым и является цитоплазма волоконных клеток хрусталика, обеспечивается пространственным упорядочением близлежащих молекул белка [33].

Исследования методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей кортекса и ядра целого хрусталика животных разных классов (рыбы, земноводные, млекопитающие) показали, что периодическое изменение плотности белка, свидетельствующее об упорядоченности белков, присутствует только в кортексе, но не в ядре хрусталиков [34]. Аналогичные результаты также с использованием малоуглового рассеяния рентгеновских лучей были получены в работе Mirarefi et al. [35]. Авторы исследовали срезы хрусталика, что позволило более точно позиционировать исследуемый отдел. По всей видимости, отсутствие упорядоченности белка в ядре является кажущимся. В действительности пространство между флуктуациями плотности белка заполнено низкомолекулярным у-кристаллином. Таким образом, кортикальную часть хрусталика отличает от ядерной области наличие флуктуаций концентрации белка. Это подтверждается тем, что светорассеяние кортекса хрусталика превосходит светорассеяние его ядерной области [36, 37].

ПОМУТНЕНИЕ ХРУСТАЛИКА – КАТАРАКТА

Помутнение хрусталика или катаракта является основной причиной слабовидения и слепоты в мире [38]. Помутнения хрусталика классифицируют по локализации помутнения (ядерная, кортикальная, диффузная и др.), по внешнему виду (голубая, черная, дисковидная, порошкообразная, кораллообразная и т.д.), по этиологической причине (возрастная, диабетическая (сахарная), радиационная и т.д.), а также по времени образования (наследственная, неонатальная, ювенильная, пресенильная и сенильная) [39]. Однако, с нашей точки зрения, катаракты удобно разделить на две большие группы: наследственные и приобретенные.

Наследственные катаракты относят к так называемым Менделевским заболеваниям. Подробно генетика и патофизиология наследственных катаракт рассмотрена в нескольких обзорах [40–42].

Среди основных этиологических причин возникновения приобретённых помутнений хрусталика называют, прежде всего, возраст, затем следуют ультрафиолетовый свет, диабет, лечение системными стероидами, радиацию [43-46]. Интересно отметить, что в 2012 г. была существенно снижена (с 2 до 0,6 Гр) норма минимальной дозы радиоактивного излучения, вызывающая образование катаракты у человека [47]. Необходимо отметить вклад мутаций генов в формирование приобретённой катаракты. Дефектный белок может лишь со временем при воздействии каких-либо неблагоприятных факторов проявить свои негативные свойства. Примером может быть дефектный βА3-кристаллин, который характерен для аутосомно-доминантной зонулярной катаракты и обладает пониженной устойчивостью к действию ультрафиолета по сравнению с белком дикого типа [48-50].

Исследование микроскопической картины возрастных катаракт показало, что в хрусталиках обнаруживаются различного рода морфологические изменения — изменения формы волоконных клеток, разрывы мембран, появление вакуолей, набухание клеток и др. [51—54]. При диабетической катаракте отмечено образование большого количества набухших волоконных клеток [55]. Радиационная катаракта сопровождается нарушением упаковки волоконных клеток задней кортикальной зоны хрусталика [56]. Вместе с тем оценить вклад тех или иных морфологических дефектов в увеличение светорассеяния долгое время не представлялось возможным.

В цикле работ, проведённых в лаборатории Костелло, на основе расчётов с использованием теории рассеяния Густава Ми были выявлены структуры, ответственные за помутнение. Оказалось, что перечисленные выше морфологические изменения клеток хрусталика не могут быть причиной помутнения [57]. Главными «рассеивателями» света в хрусталике являются флуктуации концентрации белка в цитоплазме волоконных клеток и так называемые мультиламеллярные тела, присутствующие в этих клетках хрусталика [58–62]. Мультиламеллярные тела – это белок-липидные образования сферической формы и размером порядка 1–4 мкм. Их количество в прозрачном и катарактальном хрусталике одного возраста различается в 7,5 раз [63, 64]. Удивительно, но высокомолекулярные агрегаты, появление которых в хрусталике связывали с помутнением, не могут создать достаточный уровень флуктуаций концентрации белка, необходимый для увеличения светорассеяния [62].

Ключевая роль нарушения ближнего порядка упаковки белковых молекул в возникновении помутнения хрусталика была предсказана ещё в 1971 г. Benedek [32], однако экспериментальное подтверждение этому предположению было получено только через 50 лет [58]!

ЕДИНЫЙ МЕХАНИЗМ КАТАРАКТОГЕНЕЗА

Классификация катаракт по этиологическому признаку вызывает естественное предположение, что и механизмы возникновения различных видов катаракт должны различаться. Для проверки этого предположения было исследовано появление и развитие помутнений хрусталика, возникающих при действии катарактогенных факторов, механизмы действия которых должны принципиально различаться [65–68]. Так, по сложившимся к 2010 г. представлениям, радиационная катаракта возникала вследствие нарушений пролиферации клеток эпителия и образования дефектов упаковки волоконных клеток в заднем кортикальном пространстве [69, 70]. В механизме действия ультрафиолета, наряду с воздействием на эпителий, большую роль отводили прямому фотохимическому повреждению белка [71]. Развитие старческой катаракты связывали с возрастными дегенеративными изменениями ткани хрусталика [72].

Нами были проведены эксперименты на одной линии мышей (гибрид F1(C57BIXCBA)) двойным слепым методом в условиях одного вивария [67]. Было обнаружено, что в хрусталике животных, получавших столь разные по своей природе воздействия — облучение гамма-лучами, облучение ультрафиолетом диапазона А и старение - образуются одинаковые типы помутнений. У животных всех групп наблюдали диффузные и ограниченные (точечные, нитевидные, кораллообразные и др.) помутнения, которые затрагивали как кортикальную, так и ядерную зоны хрусталика. Действие этих факторов различалось только по интенсивности: наименее катарактогенным был фактор возраста, эффект воздействия ультрафиолета и радиации в использованных дозах был примерно одинаков, наиболее «вредным» было совместное действие нескольких факторов. При исследовании микроскопической структуры тканей катарактальных хрусталиков во всех экспериментальных

группах, по сравнению с молодыми 3-месячными животными, обнаруживались лишь неспецифические изменения, связанные со старением животных, а именно: уплощение клеток эпителия, вакуолизация и дефрагментация их ядер, образование участков свободных от клеток и многослойных структур из фибробласто-подобных клеток, появление в цитоплазме волоконных клеток микровакуолей, набухание и слияние клеток кортекса [66]. При анализе белкового состава, проведённого методом разностного электрофореза, также не было найдено различий между исследованными группами [65, 68].

Важные данные по сравнительному развитию радиационной и старческой катаракты были получены в группе Пендерграсса. При исследовании хрусталиков молодых и старых мышей линии C57BL/6 выяснилось, что у старых мышей (27-31 мес.) наблюдается образование в слое эпителия больших участков свободных от клеток. В кортексе хрусталика было обнаружено присутствие ядер, митохондрий, что свидетельствовало о нарушении процесса дифференцировки волоконных клеток. У молодых (3 мес.) и годовалых мышей таких изменений отмечено не было. Однако если 3-месячных мышей облучить рентгеновскими лучами в дозе 11 Гр, то к 14 мес. у них развиваются точно такие же изменения в хрусталике, какие наблюдали у 26-месячных интактных животных [73, 74]. При исследовании цельных хрусталиков мыши с помощью конфокальной микроскопии была обнаружена колокализация митохондрий, участков выработки АФК, белковых агрегатов и участков помутнений хрусталика [75, 76].

Таким образом, полученные данные указывали на то, что важнейшие катарактогенные факторы — возраст, ультрафиолет и ионизирующая радиация — вызывают одинаковые морфологические и биохимические изменения в ткани хрусталика.

Какой же механизм может привести к такому результату? Известно, что низкое парциальное давление кислорода (всего 2 мм рт. ст.) является необходимым условием для нормальной деградации митохондрий и других органелл волоконной клетки [20, 77-79]. Однако при гибели клеток эпителиального слоя, вызванной действием катарактогенного фактора, кислород через образовавшиеся бреши диффундирует в ткань хрусталика. Повышение концентрации кислорода приводит к тому, что нарушается процесс формирования волоконных клеток – в них остаются полуразрушенные митохондрии [76]. В таких полуразрушенных митохондриях, да ещё при повышенной концентрации кислорода, в цепи электронного транспорта с участием NADH-KoQ-редуктазы и KoQH₂-цитохром *с*-редуктазы начинают образовываться активные супероксидные анион-радикалы. В результате запускается окислительная модификация белков хрусталика. Напомним, что помутнения в хрусталике колокализованы с митохондриями и зонами повышенной концентрации AФK.

Развитие диабетической катаракты также сопровождается гибелью клеток эпителия [80]. При этом наблюдаемые изменения структуры волоконных клеток при диабетической катаракте аналогичны изменениям при возрастной катаракте [81]. Косвенным указанием на участие АФК в формировании диабетической катаракты является торможение развития помутнения с помощью антиоксидантов [82–85].

В фундаментальном обзоре, посвящённом механизмам формирования стероидной катаракты, указывается, что наиболее правдоподобной гипотезой является нарушение дифференцировки и миграции волоконных клеток [45].

Таким образом, к настоящему времени накопилось достаточное количество убедительных доказательств того, что развитие катаракты под действием различных катарактогенных факторов может быть объяснено в рамках единого механизма. Суть этого механизма сводится к тому, что под воздействием повреждающего фактора гибнут клетки эпителиального слоя хрусталика, и в нём появляются пустоты («бреши»). Вследствие этого усиливается поступление кислорода внутрь хрусталика, а это нарушает морфогенез волоконных клеток, в частности распад клеточных органелл. В результате в кортексе появляются клетки, в которых сохранились полуразрушенные митохондрии. Увеличение в хрусталике концентрации кислорода приводит и к усилению образования в митохондриях АФК, откуда они диффундируют в цитоплазму. Воздействие АФК приводит к денатурации и агрегации белка, нарушению белок-белковых взаимодействий, изменению упаковки белков цитоплазмы и усилению светорассеяния в цитоплазме хрусталика. Помутнение сначала затрагивает кортикальные области, но постепенно распространяется и на ядерную область хрусталика [86].

МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖИВАНИЯ ПРОЗРАЧНОСТИ ХРУСТАЛИКА

Белки хрусталика в отличие от белков других органов практически не обмениваются [27]. Это означает, что белки, появившиеся ещё на стадии эмбрионального развития глаза, должны служить в течение всей жизни организма. Поэтому в

хрусталике существуют и функционируют механизмы, которые противодействуют посттрансляционной модификации белков или блокируют их негативное воздействие. Эффективность таких механизмов исключительно высока. По этой причине в природе продолжительность жизни животного обычно короче, чем время, необходимое для развития старческой катаракты.

Систему защиты хрусталика можно разделить на три уровня. Первый уровень – это система антиоксидантной защиты, препятствующая возникновению посттрансляционных модификаций окислительной природы, а также ферменты, способствующие восстановлению окисленных белков [87–92]. Второй уровень – это система, предотвращающая негативные последствия влияния посттрансляционных модификаций на взаимодействие белков, а именно это α-кристаллин, способный предупреждать агрегацию белков [93, 94]. Третий уровень – это система элиминации повреждённых белков системами 20S и 26S протеазных комплексов [95, 96].

По каждому из этих уровней защиты существует обширная литература, обзор которой выходит за рамки данной статьи. Но некоторые элементы этих уровней мы проиллюстрируем. Инъекция селенита натрия 10-12-дневным крысятам вызывает окислительный стресс в хрусталике, что приводит к быстрому (в течение нескольких дней) образованию плотной ядерной катаракты [97]. Однако если предварительно ввести крысятам йодид калия, что вызывает небольшой окислительный стресс в хрусталике, то в нём активизируется синтез глутатиона, в результате чего катаракта не развивается [98]. Отметим интересную особенность системы удаления повреждённых белков в хрусталике, связанную с убиквитиновым циклом. В условиях окислительного стресса убиквитиновый протеолиз в хрусталике ингибируется [95, 99, 100]. Поэтому предполагается, что преодоление последствий окислительного стресса в хрусталике достигается не удалением всех повреждённых белков, как в других тканях, а их максимальной репарацией.

α-КРИСТАЛЛИН: СТРУКТУРА И ШАПЕРОНОПОДОБНАЯ ФУНКЦИЯ

α-Кристаллин как шапероноподобный белок тормозит агрегацию повреждённых белков и таким образом поддерживает прозрачность хрусталика [101, 102]. Два гена с 60%-ной идентичностью, CRYAA и CRYAB, кодируют полипептиды αА-кристаллин и αВ-кристаллин, образующие α-кристаллин [29]. αА- и αВ-кристаллины состоят из 173 и 175 аминокислотных

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

остатков (а.о.) и имеют молекулярную массу 19,8 и 20,0 кДа [27]. Эти полипептиды формируют пул олигомерных молекул с массой 160–1200 кДа [103]. Соотношение α А-кристаллина и α В-кристаллина в α -кристаллине варьирует. Например, у телят это отношение равно 2 : 1, тогда как у взрослых особей крупного рогатого скота – 3 : 1 [104]. Молярное отношение α А : α В различается и у разных видов. Так, например, у акулы это отношение равно 1 : 3, у сома – 19 : 1, у кенгуру – 9 : 1 и у человека 54 лет – 3 : 2 [105, 106]. Физиологический смысл таких вариаций пока непонятен.

Как и у остальных представителей семейства малых белков теплового шока, в полипептиде αкристаллина можно выделить три участка: *N*концевой участок, состоящий из 60 а.о., центральный участок, состоящий из 90 а.о., и *C*-концевой участок, состоящий из 25 а.о. [107, 108]. Укорочение *N*-концевого и *C*-концевого участков приводит как к потере способности образовывать олигомеры, так и к снижению шапероноподобной функции белка [109–111]. Точечные мутации в центральном участке делают белок склонным к агрегации [112]. Замены а.о. в консервативном участке IPV/I *C*-концевого участка нарушают взаимодействие полипептидов при формировании олигомера [113].

Молекула α-кристаллина является высокодинамичной системой, построенной из блоков, в роли которых выступают как мономеры белка, так и небольшие олигомеры, которые присоединяются и отсоединяются от основной молекулы [94]. Это процесс зависит от многих факторов: температуры, ионной силы раствора, концентрации и т.д. Так, например снижение температуры с 37 до 4 °С приводит к увеличению диаметра олигомера от 17,9 до 19,75 нм [114]. Поэтому размер нативного α-кристаллина *in vitro* зависит от условий выделения. Вместе с тем изучение хрусталика in vivo с помощью динамического рассеяния света, а также изолированного хрусталика с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей показало, что размер частицы α-кристаллина равен примерно 20 нм [33, 35].

Было предложено несколько различных молекулярных моделей белка: мицеллярная модель [115, 116] – это модель, в которой олигомер образовывался из полипептидных тетрамеров [117]; трехслойная модель [118]; модель боба с отростками [114]. Фундаментальный обзор Haslbeck et al. [119] подробно рассматривает молекулярные модели гомоолигомеров, образованных α А- и α В-кристаллинами. Однако следует подчеркнуть, что задача создания модели нативного α -кристаллина ещё не решена.



Рис. 3. Схема строения α -кристаллина. *а* – Расположение отдельных полипептидов; δ – сечение частицы α -кристаллина

Недавно мы исследовали структуру α-кристаллина, используя комбинацию методов динамического светорассеяния, аналитического центрифугирования и электронной микроскопии в сочетании с 3D-реконструкцией изображений [103]. Оказалось, что в растворе одновременно присутствует целая популяция олигомеров α-кристаллина, размеры которых варьируют от 8 до 25 нм. При этом один из олигомеров размером 12-14 нм превалирует в популяции молекул. На основании полученных данных была построена трёхмерная модель (рис. 3), согласно которой белок имеет асимметричную форму, близкую к форме боба размером 13 × 19 нм. Масса частицы составляла 750-830 кДа. Анализ электронных плотностей показал, что молекула имеет плотный корковый слой и разряженную заполненную нитевидными структурами, но не пустую, ядерную область.

Такая молекула α-кристаллина находится преимущественно в кортикальной области хрусталика, тогда как в ядерной части хрусталика преобладает его высокомолекулярная форма – α_н-кристаллин. Исключительно гетерогенный α_н-кристаллин имеет массу от 50 000 кДа. Под электронным микроскопом а_н-кристаллин выглядит как конгломерат частиц, размер которых несколько меньше α-кристаллина [120, 121]. Размеры а_н-кристаллина увеличиваются с возрастом, также возрастает и его относительное количество [122, 123]. Считается, что к образованию α_н-кристаллина приводят посттрансляционные модификации α-кристаллина. Однако прямое повреждение белка ультрафиолетом не приводило *in vitro* к образованию α_н-кристаллина [124]. Вероятно, для образования а_н-кристаллина необходимо присутствие и других белков [125]. Исследование свойств $\alpha_{\rm H}$ -кристаллина затруднено вследствие его высокой полидисперсности. Есть сведения о том, что шапероноподобная активность $\alpha_{\rm H}$ -кристаллина, измеренная на модели тепловой агрегации белков, понижена [126, 127]. Вместе с тем на модели агрегации инсулина в присутствии дитиотреитола показано, что активность $\alpha_{\rm H}$ -кристаллина не отличается от таковой для α -кристаллина из кортекса [128]. Учитывая то, что основной световой поток проходит через ядерную область хрусталика, исследование роли $\alpha_{\rm H}$ -кристаллина как шапероноподобного белка в противодействии развитию помутнения чрезвычайно важно.

Свойства молекулярного шаперона были обнаружены у α-кристаллина около 30 лет назад [101, 102]. α-Кристаллин оказался способен не только предупреждать агрегацию дестабилизированных белков, но и частично восстанавлиденатурированных вать структуру молекул [129–131]. Однако свойства истинного шаперона α-кристаллин демонстрировал лишь в модельных системах, в которых целевыми белками служили белки, денатурированные воздействием детергентов. Рефолдинг этих белков в присутствии α-кристаллина после удаления детергента проходил более полно, чем в его отсутствие. Однако если использовать в качестве целевого белка химически модифицированный белок, например, окисленный _{β_L}-кристаллин, то восстановить его структуру в присутствии αкристаллина не удаётся [132].

Для исследования механизма шапероноподобного действия α-кристаллина широко используются модельные системы, основанные на исследовании кинетики процесса агрегации повреждённых белков. Эта тема подробно рассмотрена в нескольких обзорах [133–139]. Применение методов кинетического анализа позволило количественно оценивать шапероноподобную активность белков, что исключительно важно как для понимания механизма шапероноподобной активности, так и для подбора потенциальных претендентов для создания новых антикатарактальных препаратов. Например, с помощью кинетического анализа кривых агрегации удалось показать, что активность известного химического шаперона аргинина в 300 раз меньше, чем активность α-кристаллина [140].

Исследование механизма шапероноподобной активности в условиях *in vitro* показало, что диссоциация α-кристаллина является важным, хотя и не необходимым звеном в этом акте [140, 141]. При этом целевой белок образует первичные низкомолекулярные комплексы с диссоциированной формой α-кристаллина. Впоследствии низкомолекулярные комплексы образуют более крупные агломераты, которые



Рис. 4. Схема шапероноподобной активности α-кристаллина в хрусталике

могут даже выпадать в осадок [132]. Однако условия in vitro далеки от условий в клетках хрусталика. Во-первых, высокая концентрация белка в цитоплазме будет препятствовать диссоциации α-кристаллина. Действительно, показано, что в условиях краудинга, моделирующего высокую концентрацию белка в цитоплазме клеток хрусталика, шапероноподобная активность α-кристаллина оказалась сниженной [142–145]. Вовторых, диссоциация α-кристаллина обнаружена при достаточно высоких концентрациях целевого белка в среде, сравнимых с концентрацией, собственно, а-кристаллина. Это означает, что в условиях реального хрусталика, чтобы достичь значимого уровня диссоциации α-кристаллина, практически треть белков (β- и γ-кристаллина) должна быть одномоментно повреждена. Очевидно, такие условия в живом хрусталике просто невозможны. Поэтому мы предложили следующий механизм шапероноподобного действия α-кристаллина в хрусталике (рис. 4).

α-Кристаллин в клетке существует в виде динамической системы, состоящей из олигомера белка и диссоциированных фрагментов (вероятно, мелких олигомеров и мономеров). Любой из этих компонентов в результате диффузии может столкнуться с дестабилизированными формами γ- или β-кристаллина и образовать с ними комплекс. Учитывая, что степень диссоциации белка в хрусталике невелика, то, скорее всего, это будет олигомер α-кристаллина. При этом повреждённый белок связывается на поверхности олигомера α-кристаллина. В дальнейшем вследствие постоянного обмена частицами белка с другими олигомерами α-кристаллина повреждённый белок постепенно оказывается «погребённым» внутри комплекса, что исключает взаимодействие и агрегацию поврежденных молекул [132].

ВОЗРАСТНОЕ СНИЖЕНИЕ ШАПЕРОНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ α-КРИСТАЛЛИНА

В основе современной концепции катарактогенеза лежит предположение о том, что со

временем шапероноподобная активность αкристаллина в хрусталике ослабевает. В результате в клетках накапливаются денатурированные формы белков (γ-и β-кристаллинов), начинается их агрегация, в результате чего усиливаются флуктуации концентрации белка, на границе этих флуктуаций возникает светорассеяние и хрусталик мутнеет [32]. Действительно, в опытах *in vivo* было обнаружено возрастное снижение шапероноподобной активности как α -кристаллина, так и $\alpha_{\rm H}$ -кристаллина; подобное снижение активности наблюдается и при образовании катаракты [146-150]. Как возрастное снижение шапероноподобной активности α-кристаллина, так и снижение его активности при катаракте сопровождается образованием посттрансляционных модификаций различной природы [148, 151, 152]. Отсюда возникло предположение, что снижение шапероноподобной активности α-кристаллина вызвано именно его посттрансляционной модификацией. Это было подтверждено в многочисленных экспериментах *in vitro* [153–155]. Например, повреждение α-кристаллина с помощью диметил-3,3'-дитиобиспропионимидата, вызывающее образование дисульфидных связей, снижало его активность. При этом добавка дитиотреитола, восстанавливающего дисульфидные связи, частично восстанавливала шапероноподобную активность белка [156]. УФ-Повреждение α-кристаллина вызывало экспоненциальное снижение его активности, что хорошо коррелировало со структурными изменениями α-кристаллина [157].

Однако, несмотря на огромный массив информации, касающейся влияния посттрансляционных модификаций α-кристаллина на снижение его активности в хрусталике, строгих доказательств, которые связывали бы количество конкретных посттрансляционных модификаций со степенью снижения его шапероноподобной активности пока не получено. На наш взгляд, сочетание расчётных методов физики полимеров, оценивающих влияние модификаций тех или иных а.о. на структуру белковой цепи, и данных масс-спектрометрии может позволить доказать наличие такой связи.

Очевидно, что молекула α-кристаллина может связать лишь какое-то определённое количество дестабилизированного белка. Поэтому исчерпание способности α-кристаллина связывать повреждённый белок является ещё одной причиной уменьшения шапероноподобной активности α-кристаллина в хрусталике. При исследовании *in vitro* взаимодействия УФ-поврежденного β_L-кристаллина с нативным α-кристаллином было показано, что белковый комплекс остаётся растворимым в том случае, если содержание целевого белка не превышает 5–7% [132]. При связывании большего количества повреждённого белка масса комплекса возрастает существенно, и растворимость его падает. Вероятно, в хрусталике происходит аналогичный процесс: α-кристаллин, перегруженный связанными с ним повреждёнными белками, сначала образует высокомолекулярные формы, а затем выпадает в осадок. Интересно отметить, что шапероноподобная активность α-кристаллина, полученного из водонерастворимой фракции белка хрусталика, была снижена на 40% по сравнению с нативным белком, но не полностью потеряна [156]. Это указывает на то, что нарушение растворимости (выпадение в осадок) комплекса α-кристаллин-повреждённый белок начинается задолго до того, как все связывающие сайты α-кристаллина будут заняты дестабилизированными белками. В этой связи необходимо упомянуть недавнее исследование механизма возникновения помутнения хрусталика при врождённой катаракте [158]. По мнению авторов исследования, причиной возникновения помутнения хрусталика является вовсе не исчерпание способности α-кристаллина связывать повреждённые белки, а изменение белок-белковых взаимодействий, возникающее вследствие замены аминокислот в случае наследственных катаракт, или посттрансляционные модификации белков в случае катаракт возрастных. Однако, как нам представляется, хотя такая гипотеза и может иметь право на существование, но пока она ещё слабо подкреплена экспериментальными данными.

МОДУЛЯЦИЯ ШАПЕРОНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ α-КРИСТАЛЛИНА ЭКЗОГЕННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И КОНСЕРВАТИВНОЕ ЛЕЧЕНИЕ КАТАРАКТЫ

Было показано, что производное β-аланина и пантотеновой кислоты – пантетин – способно за счёт усиления шапероноподобных свойств αкристаллина эффективно предупреждать развитие селенитовой катаракты у крыс [159–162]. Предпринимались попытки усилить шапероноподобную активность α-кристаллина в хрусталике, используя участки молекулы α-кристаллина, которые могли бы отвечать за его шапероноподобную активность [163, 164]. Однако самый активный пептид с последовательностью KFVIFLDVKHFSPEDLTVK, хотя и препятствовал преципитации белка, но не тормозил образование агрегатов размером 50–500 нм [165].

Некоторые соединения, например, трегалоза, аргинин, циклодекстрины, выступая как химические шапероны, способны затормозить процесс агрегации белков в условиях *in vitro* [166–169]. Однако действуют такие соединения в очень больших концентрациях, а именно 0,2 М и выше, и поэтому они вряд ли могут рассматриваться в качестве потенциальных антикатарактальных средств.

Исследование механизма антикатарактального эффекта карнозина и его производных показало, что в основе действия этих соединений может лежать их способность тормозить агрегацию дестабилизированных белков. Наиболее активным среди производных карнозина оказался N-ацетилкарнозин [170]. Свою активность N-ацетилкарнозин в отношении агрегации УФ-повреждённого _β-кристаллина проявлял уже в миллимолярных концентрациях, что существенно отличало его от химических шаперонов. Вероятно, антиагрегационный эффект этого соединения связан с его амфифильными свойствами и целевым связыванием на гидрофобных сайтах денатурированного белка, участвующих в агрегации. Для таких соединений мы предложили термин «минишаперон» [171].

Привлекательной выглядела идея объединить в одном препарате соединение, увеличивающее способность α-кристаллина связывать денатурированные белки, и вещества, которые сами обладают шапероноподобными свойствами, а именно пантетин и N-ацетилкарнозин. Оказалось, что такая композиция соединений способна предупреждать развитие помутнения хрусталика, индуцированное облучением ближним ультрафиолетом в опытах *in vivo* [172–175].

Средства, применяемые для консервативного лечения катаракты, были способны лишь замедлить развитие катаракты. Но возможно ли обратить этот процесс, растворив каким-то образом белковые агрегаты в хрусталике? Соединение ланостерол, а также некоторые другие производные стероидов оказались способными не только предупреждать агрегацию *in vitro*, но и растворять агрегаты белка *in vivo* [176, 177]. В журналах *Nature* и *Science* были опубликованы оптимистичные отзывы ведущих исследователей в области патогенеза катаракты, прогнозирующие на этой основе создание лекарственного препарата, способного излечивать это заболевание [178, 179]. Правда, дальнейшие исследования показали, что не все так просто: в некоторых случаях препараты показывали хороший результат, а в некоторых были неэффективны [180—183]. Очевидно, что это направление требует дальнейших исследований.

Идея замедлить образование катаракты с помощью соединений, тормозящих процесс свободнорадикального окисления (о роли свободнорадикального окисления в формировании катаракты см. выше), возникла давно. Например, в состав антикатарактальных капель вводили глутатион и цистеин [184]. Считается, что лечебный эффект широко применяемого антикатарактального препарата Сенкаталин (Каталин) обусловлен его антиоксидантными свойствами [185]. Однако возник удивительный парадокс – антикатарактальные препараты демонстрировали высокую активность в лабораторном эксперименте, но были бесполезными в клинической практике [186]. Секрет оказался прост. Как показало специальное исследование, применение препаратов начинали тогда, когда в хрусталике уже образовалась катаракта. Кроме того, немаловажным оказался и человеческий фактор: основная масса и врачей, и пациентов не верила в эффективность консервативного лечения катаракты [187]. Таким образом, с одной стороны, разработаны препараты, пригодные для консервативного лечения катаракты, с другой стороны, их применение в клинике оказывается неэффективным вследствие слишком позднего применения. Выход нам видится в разработке и широком применении в практике средств и методов ранней диагностики катаракты.

Профилактику и лечение катаракты надо начинать задолго до появления клинических признаков заболевания. Примером ранней диагностики может быть диагностика с использованием прибора, созданного Ansari [188–191]. Принцип его действия основан на методе измерения динамического рассеяния света. Динамическое рассеяние света позволяет *in vivo* не только диагностировать начальные стадии катаракты, которые невозможно зафиксировать другими известными методами, но и оценить количество активного, то есть способного связывать повреждённые белки, α -кристаллина в хрусталике. Снижение уровня активного α -кристаллина ниже некоторого порогового значения является указанием на скорое появление в хрусталике помутнения. В заключение заметим, что в США в последние годы активно ведутся уже клинические испытания прибора Ansari [192].

Таким образом, применение комплекса антикатарактальных препаратов шапероноподобного и антиоксидантного действия в сочетании с ранней диагностикой опасности возникновения катаракты может позволить предупреждать развития катаракты и, как следствие, уменьшить число случаев, требующих хирургического лечения.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00178 для К.О.М.) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-795, внутренний № 13.1902.21.0027 для М.А.О.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Описанные в настоящей статье результаты, полученные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений, в которых проводились исследования, а именно «Научно-исследовательский институт глазных болезней» (г. Москва) и «Объединенный институт ядерных исследований» (г. Дубна), и утвержденным правовыми актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. De Korte, C. L., Van Der Steen, A. F., Thijssen, J. M., Duindam, J. J., Otto, C., et al. (1994) Relation between local acoustic parameters and protein distribution in human and porcine eye lenses, *Exp. Eye Res.*, **59**, 617-627, doi: 10.1006/exer.1994.1147.
- 2. Fagerholm, P. P., and Philipson, B. T. (1981) Human lens epithelium in normal and cataractous lenses, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **21**, 408-414.
- Siebinga, I., Vrensen, G. F., De Mul, F. F., and Greve, J. (1991) Age-related changes in local water and protein content of human eye lenses measured by Raman microspectroscopy, *Exp. Eye Res.*, 53, 233-239, doi: 10.1016/0014-4835(91)90079-t.

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

- 4. Ott, M. (2006) Visual accommodation in vertebrates: mechanisms, physiological response and stimuli, *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.*, **192**, 97-111, doi: 10.1007/s00359-005-0049-6.
- Kuszak, J. R., Zoltoski, R. K., and Tiedemann, C. E. (2004) Development of lens sutures, *Int. J. Dev. Biol.*, 48, 889-902, doi: 10.1387/ijdb.041880jk.
- Kuszak, J. R., Mazurkiewicz, M., and Zoltoski, R. (2006) Computer modeling of secondary fiber development and growth: I. Nonprimate lenses, *Mol. Vis.*, 12, 251-270.
- 7. Kuszak, J. R., Mazurkiewicz, M., Jison, L., Madurski, A., Ngando, A., et al. (2006) Quantitative analysis of animal model lens anatomy: accommodative range is related to

3*

fiber structure and organization, Vet. Ophthalmol., 9, 266-280, doi: 10.1111/j.1463-5224.2006.00506.x.

- Kuszak, J. R. and Zoltoski, R. K. (2006) in Focus on Eye 8.
- Research (Ioseliani, O. R., ed.) New-York, pp. 117-132. Shick, J. M., and Dunlap, W. C. (2002) Mycosporine-like 9 amino acids and related Gadusols: biosynthesis, acumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms, Annu. Rev. Physiol., 64, 223-262, doi: 10.1146/annurev. physiol.64.081501.155802.
- 10. Werten, P. J., Roll, B., van Aalten, D. M., and de Jong, W. W. (2000) Gecko iota-crystallin: how cellular retinol-binding protein became an eye lens ultraviolet filter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 3282-3287, doi: 10.1073/pnas.050500597.
- 11. Truscott, R. J., Carver, J. A., Thorpe, A., and Douglas, R. H. (1992) Identification of 3-hydroxykynurenine as the lens pigment in the gourami Trichogaster trichopterus, Exp. Eye Res., 54, 1015-1017, doi: 10.1016/0014-4835(92)90167-q.
- Van Heyningen, R. (1971) Fluorescent derivatives of 3-12. hydroxy-L-kynurenine in the lens of man, the baboon and the grey squirrel, Biochem. J., 123, 30P-31P, doi: 10.1042/ bj1230030p.
- Van Heyningen, R. (1971) Fluorescent glucoside in the 13. human lens, Nature, 230, 393-394, doi: 10.1038/230393a0.
- Cuthbertson, F. M., Peirson, S. N., Wulff, K., Foster, R. G., and Downes, S. M. (2009) Blue light-filtering 14. intraocular lenses: review of potential benefits and side effects, J. Cataract Refract. Surg., 35, 1281-1297, doi: 10.1016/j.jcrs.2009.04.017.
- Meyers, S. M., Ostrovsky, M. A., and Bonner, R. F. (2004) 15. A model of spectral filtering to reduce photochemical damage in age-related macular degeneration, Trans. Am. Ophthalmol. Soc., 102, 83-93.
- 16. Nolan, J. M., O'Reilly, P., Loughman, J., Stack, J., Loane, E., et al. (2009) Augmentation of macular pigment following implantation of blue light-filtering intraocular lenses at the time of cataract surgery, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 50, 4777-4785, doi: 10.1167/iovs.08-3277.
- Wu, J., Seregard, S., and Algvere, P. V. (2006) Photochemical damage of the retina, Surv. Ophthalmol., 51, 461-481, doi: 10.1016/j.survophthal.2006.06.009
- 18. Линник Л. Ф., Островский М. А., Салиев М. А. (1991) Искусственные хрусталики, поглощающие ультрафиолетовые лучи: безопасность, эффективность и перспектива использования в офтальмохирургии, Оф*тальмохирургия*, **4**, 3-7. Тахчиди Х. П., Линник Л. Ф., Островский М. А., Зак
- 19. П. П. (2007) Отдаленные результаты наблюдений после имплантации искусственного хрусталика «Спектр» с естественной спектральной характеристикой, Оф*тальмохирургия*, **1**, 11-21.
- 20. McNulty, R., Wang, H., Mathias, R. T., Ortwerth, B. J., Truscott, R. J., et al. (2004) Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens, J. Physiol., 559, 883-898, doi: 10.1016/0014-5793(94)00601-6.
- 21. Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Щербин Д. Г., Чекана А. Ю., Голуб О. М. (2003) Фосфоресцентный анализ ткани хрусталика в норме и при катаракте, Белорусский офтальмологический журнал, 2-3, 13-16.
- Troekel, S. (1962) The physical basis for transparency of 22. the crystalline lens, Invest. Ophthalmol., 1, 493-501.
- Орехович В. Н., Фирфарова К. Ф., Шпикитер В. О. 23. (1955) Физико-химическая характеристика растворимых белков хрусталика, Український біохімічний журнал, ХХУП, 355-363.
- 24. Resnik, R. A. (1957) Lens proteins. I. Alpha crystallin of calf lens, Am. J. Ophthalmol., 44, 357-362
- Harrington, V., Srivastava, O. P., and Kirk, M. (2007) 25. Proteomic analysis of water insoluble proteins from normal and cataractous human lenses, Mol. Vis., 13, 1680-1694.

- 26. Bloemendal, H. (1977) The vertebrate eye lens, Science, 197, 127-138, doi: 10.1126/science.877544.
- Bloemendal, H., De Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, 27. N. H., Slingsby, C., et al. (2004) Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins, Prog. Biophys. Mol. Biol., 86, 407-485, doi: 10.1016/j.pbiomolbio. 2003.11.012.
- Gangalum, R. K., Kim, D., Kashyap, R. K., Mangul, S., 28. Zhou, X., et al. (2018) Spatial analysis of single fiber cells of the developing ocular lens reveals regulated heterogeneity of gene expression, iScience, 10, 66-79, doi: 10.1016/ j.isci.2018.11.024.
- 29 Bloemendal, H., and de Jong, W. W. (1991) Lens proteins and their genes, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 41, 259-281, doi: 10.1016/s0079-6603(08)60012-4.
- Sharma, K. K., and Santhoshkumar, P. (2009) Lens aging: 30. effects of crystallins, Biochim. Biophys. Acta, 1790, 1095-1108, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.008.
- 31. Sergeev, Y. V., Hejtmancik, J. F., and Wingfield, P. T. (2004) Energetics of domain-domain interactions and entropy driven association of beta-crystallins. Biochemistry, 43, 415-424, doi: 10.1021/bi034617f.
- Benedek, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye, 32 Appl. Opt., 10, 459-473, doi: 10.1364/AO.10.000459.
- Delaye, M., and Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency, Nature, 302, 415-417, doi: 10.1038/302415a0.
- 34. Krivandin, A. V., and Muranov, K. O. (1999) Comparative study of the crystallin supramolecular structure in the carp, frog, and rat lenses by small-angle roentgen ray scattering, Biofizika, 44, 1088-1093.
- 35. Mirarefi, A. Y., Boutet, S., Ramakrishnan, S., Kiss, A. J., Cheng, C. H., et al. (2010) Small-angle X-ray scattering studies of the intact eye lens: Effect of crystallin composition and concentration on microstructure, Biochim. Biophys. Acta, 1800, 556-564, doi: 10.1016/j.bbagen.2010. 02.004.
- 36 Nomura, H., Shimokata, H., Niino, N., Ando, F., Sugita, J., et al. (2000) Estimation of anterior nucleus of lens by Scheimpflug image before and after pupil dilatation, Jpn. J. Ophthalmol., 44, 682-685, doi: 10.1016/s0021-5155(00)00287-2.
- Yaroslavsky, I. V., Yaroslavsky, A. N., Otto, C., Puppels, G. J., Vrensen, G. F., et al. (1994) Combined elastic and 37. Raman light scattering of human eye lenses, Exp. Eye Res., **59**, 393-399, doi: 10.1006/exer.1994.1123. Fricke, T. R., Holden, B. A., Wilson, D. A.,
- 38. Schlenther, G., Naidoo, K. S., et al. (2012) Global cost of correcting vision impairment from uncorrected refractive error, Bull. World Health Organ., 90, 728-738, doi: 10.2471/BLT.12.104034.
- 39. Вит В. В. (2002) в кн. Катаракта (под ред. Веселовская З. Ф.) Книга плюс, Киев, с. 41-53.
- Berry, V., Georgiou, M., Fujinami, K., Quinlan, R., 40. Moore, A., et al. (2020) Inherited cataracts: molecular genetics, clinical features, disease mechanisms and novel therapeutic approaches, Br. J. Ophthalmol., 104, 1331-1337, doi: 10.1136/bjophthalmol-2019-315282.
- 41. Shiels, A., Bennett, T. M., and Hejtmancik, J. F. (2010) Cat-Map: Putting cataract on the map, Mol. Vis., 16, 2007-2015.
- 42. Shiels, A., and Hejtmancik, J. F. (2013) Genetics of human cataract, Clin. Genet., 84, 120-127, doi: 10.1111/cge.12182.
- 43. Harding, J. J. (2002) Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens, Ageing Res. Rev., 1, 465-479, doi: 10.1016/s1568-1637(02)00012-0.
- 44. Head, K. A. (2001) Natural therapies for ocular disorders, part two: cataracts and glaucoma, Altern. Med. Rev., 6, 141-166.
- James, E. R. (2007) The etiology of steroid cataract, J. Ocul. Pharmacol. Ther., 23, 403-420, doi: 10.1089/jop. 2006.0067.
- McCarty, C. A., and Taylor, H. R. (2002) A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts, *Dev. Ophthalmol.*, 35, 21-31, doi: 10.1159/ 000060807.
- Thorne, M. C. (2012) Regulating exposure of the lens of the eye to ionising radiations, *J. Radiol. Prot.*, **32**, 147-154, doi: 10.1088/0952-4746/32/2/147.
- 48. Hejtmancik, J. F., and Kantorow, M. (2004) Molecular genetics of age-related cataract, *Exp. Eye Res.*, **79**, 3-9, doi: 10.1016/j.exer.2004.03.014.
- Kannabiran, C., Rogan, P. K., Olmos, L., Basti, S., Rao, G. N., et al. (1998) Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the betaA3/A1-crystallin gene, *Mol. Vis.*, 4, 21.
- Sergeev, Y. V., Soustov, L. V., Chelnokov, E. V., Bityurin, N. M., Backlund, P. S., Jr., et al. (2005) Increased sensitivity of amino-arm truncated betaA3-crystallin to UV-lightinduced photoaggregation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 3263-3273, doi: 10.1167/iovs.05-0112.
- Bron, A. J., Vrensen, G. F., Koretz, J., Maraini, G., and Harding, J. J. (2000) The ageing lens, *Ophthalmologica*, 214, 86-104, doi: 10.1159/000027475.
- Vrensen, G. F. (1995) Aging of the human eye lens a morphological point of view, *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, **111**, 519-532, doi: 10.1016/0300-9629(95)00053-a.
- Creighton, M. O., Trevithick, J. R., Mousa, G. Y., Percy, D. H., McKinna, A. J., et al. (1978) Globular bodies: a primary cause of the opacity in senile and diabetic posterior cortical subcapsular cataracts? *Can. J. Ophthalmol.*, 13, 166-181.
- 54. Dilley, K. J., Bron, A. J., and Habgood, J. O. (1976) Anterior polar and posterior subcapsular cataract in a patient with retinitis pigmentosa: a light-microscopic and ultrastructural study, *Exp. Eye Res.*, **22**, 155-167, doi: 10.1016/0014-4835(76)90042-7.
- Kinoshita, J. H. (1974) Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture, *Invest. Ophthalmol.*, 13, 713-724.
- Worgul, B. V., Merriam, G. R., Jr., and Medvedovsky, C. (1989) Cortical cataract development – an expression of primary damage to the lens epithelium, *Lens Eye Toxic. Res.*, 6, 559-571.
- 57. Al-Ghoul, K. J., and Costello, M. J. (1996) Fiber cell morphology and cytoplasmic texture in cataractous and normal human lens nuclei, *Curr. Eye Res.*, **15**, 533-542, doi: 10.3109/02713689609000764.
- Costello, M. J., Burette, A., Weber, M., Metlapally, S., Gilliland, K. O., et al. (2012) Electron tomography of fiber cell cytoplasm and dense cores of multilamellar bodies from human age-related nuclear cataracts, *Exp. Eye Res.*, **101**, 72-81, doi: 10.1016/j.exer.2012.06.005.
- 59. Costello, M. J., Oliver, T. N., and Cobo, L. M. (1992) Cellular architecture in age-related human nuclear cataracts, *Invest. Ophthal. Mol. Vis. Sci.*, **33**, 3209-3227.
- Costello, M. J., Johnsen, S., Metlapally, S., Gilliland, K. O., Ramamurthy, B., et al. (2008) Ultrastructural analysis of damage to nuclear fiber cell membranes in advanced age-related cataracts from India, *Exp. Eye Res.*, 87, 147-158, doi: 10.1016/j.exer.2008.05.009.
- 61. Costello, M. J., Johnsen, S., Metlapally, S., Gilliland, K. O., Frame, L., et al. (2010) Multilamellar spherical particles as potential sources of excessive light scattering in human age-related nuclear cataracts, *Exp. Eye Res.*, **91**, 881-889, doi: 10.1016/j.exer.2010.09.013.
- 62. Taylor, V. L., and Costello, M. J. (1999) Fourier analysis of textural variations in human normal and cataractous lens

nuclear fiber cell cytoplasm, *Exp. Eye Res.*, **69**, 163-174, doi: 10.1006/exer.1999.0679.

- Gilliland, K. O., Freel, C. D., Lane, C. W., Fowler, W. C., and Costello, M. J. (2001) Multilamellar bodies as potential scattering particles in human age-related nuclear cataracts, *Mol. Vis.*, 7, 120-130.
- 64. Gilliland, K. O., Freel, C. D., Johnsen, S., Craig, F. W., and Costello, M. J. (2004) Distribution, spherical structure and predicted Mie scattering of multilamellar bodies in human age-related nuclear cataracts, *Exp. Eye Res.*, **79**, 563-576, doi: 10.1016/j.exer.2004.05.017.
- 65. Kurova, V. S., Muranov, K. O., Polianskii, N. B., Sheremet, N. L., Fedorov, A. A., et al. (2012) Experimental study of influence of different damaging factors on lens. Report 3. Changes of lens protein composition, *Vestn. Oftalmol.*, **128**, 17-19.
- Muranov, K. O., Polianskii, N. B., Bannik, K. I., Sheremet, N. L., Fedorov, A. A., et al. (2012) Experimental study of influence of different damaging factors on lens. Report 2. Features of microscopic lens changes, *Vestn. Oftalmol.*, **128**, 12-16.
- 67. Sheremet, N. L., Muranov, K. O., Polianskii, N. B., Fedorov, A. A., Bannik, K. I., et al. (2012) Experimental study of influence of different damaging factors on lens. Report 1. Features of biomicroscopic changes, *Vestn. Oftalmol.*, **128**, 8-12.
- Muranov, K. O., Polianskii, N. B., Kurova, V. S., Riabokon', A. M., Sheremet, N. L., et al. (2010) Comparative study of aging, UV treatment, and radiation on cataract formation, *Radiats. Biol. Radioecol.*, 50, 276-285.
- Broglio, T. M., and Worgul, B. V. (1982) The lens epithelium and radiation cataract. IV. Ultrastructural studies of interphase death in the meridional rows, *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **39**, 49-57, doi: 10.1007/BF02892836.
- Merriam, G. R., Jr., and Worgul, B. V. (1983) Experimental radiation cataract – its clinical relevance, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 59, 372-392.
- Hockwin, O., Kojima, M., Sakamoto, Y., Wegener, A., Shui, Y. B., et al. (1999) UV damage to the eye lens: further results from animal model studies: a review, *J. Epidemiol.*, 9, S39-S47, doi: 10.2188/jea.9.6sup_39.
 Schmitt, C., and Hockwin, O. (1990) The mechanisms of
- Schmitt, C., and Hockwin, O. (1990) The mechanisms of cataract formation, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **13**, 501-508, doi: 10.1007/BF01799507.
- 73. Wolf, N., Pendergrass, W., Singh, N., Swisshelm, K., and Schwartz, J. (2008) Radiation cataracts: mechanisms involved in their long delayed occurrence but then rapid progression, *Mol. Vis.*, **14**, 274-285.
- Pendergrass, W., Zitnik, G., Tsai, R., and Wolf, N. (2010) X-ray induced cataract is preceded by LEC loss, and coincident with accumulation of cortical DNA, and ROS; similarities with age-related cataracts, *Mol. Vis.*, 16, 1496-1513.
- Pendergrass, W., Penn, P., Possin, D., and Wolf, N. (2005) Accumulation of DNA, nuclear and mitochondrial debris, and ROS at sites of age-related cortical cataract in mice, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 4661-4670, doi: 10.1167/ iovs.05-0808.
- Pendergrass, W. R., Penn, P. E., Possin, D. E., and Wolf, N. S. (2006) Cellular debris and ROS in age-related cortical cataract are caused by inappropriate involution of the surface epithelial cells into the lens cortex, *Mol. Vis.*, 12, 712-724, doi: 10.1167/iovs.05-0808.
- 77. Bassnett, S. (2002) Lens organelle degradation, *Exp. Eye Res.*, **74**, 1-6, doi: 10.1006/exer.2001.1111.
- Bassnett, S. (2009) On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens, *Exp. Eye Res.*, 88, 133-139, doi: 10.1016/j.exer.2008.08.017.

- 79. Shestopalov, V. I., and Bassnett, S. (2003) Development of a macromolecular diffusion pathway in the lens, *J. Cell Sci.*, **116 (Pt 20)**, 4191-4199, doi: 10.1242/jcs.00738.
- Tkachov, S. I., Lautenschlager, C., Ehrich, D., and Struck, H. G. (2006) Changes in the lens epithelium with respect to cataractogenesis: Light microscopic and Scheimpflug densitometric analysis of the cataractous and the clear lens of diabetics and non-diabetics, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **244**, 596-602, doi: 10.1007/s00417-005-0091-7.
- Al-Ghoul, K. J., and Costello, M. J. (1993) Morphological changes in human nuclear cataracts of late-onset diabetics, *Exp. Eye Res.*, 57, 469-486, doi: 10.1006/exer.1993.1149.
- Ansari, N. H., and Srivastava, S. K. (1990) Allopurinol promotes and butylated hydroxy toluene prevents sugarinduced cataractogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 939-943, doi: 10.1016/0006-291x(90)91119-d.
- Kyselova, Z., Stefek, M., and Bauer, V. (2004) Pharmacological prevention of diabetic cataract, *J. Diabetes Complications*, 18, 129-140, doi: 10.1016/ S1056-8727(03)00009-6.
- Kyselova, Z., Gajdosik, A., Gajdosikova, A., Ulicna, O., Mihalova, D., et al. (2005) Effect of the pyridoindole antioxidant stobadine on development of experimental diabetic cataract and on lens protein oxidation in rats: Comparison with vitamin E and BHT, *Mol. Vis.*, 11, 56-65.
- Ross, W. M., Creighton, M. O., Trevithick, J. R., Stewart-DeHaan, P. J., and Sanwal, M. (1983) Modelling cortical cataractogenesis: VI. Induction by glucose *in vitro* or in diabetic rats: prevention and reversal by glutathione, *Exp. Eye Res.*, 37, 559-573, doi: 10.1016/0014-4835(83)90132-x.
- Муранов К. О., Островский М. А. (2013) Молекулярная физиология хрусталика, Издательство «Торус-Пресс», Москва.
- Cui, X. L., and Lou, M. F. (1993) The effect and recovery of long-term H₂O₂ exposure on lens morphology and biochemistry, *Exp. Eye Res.*, 57, 157-167, doi: 10.1006/exer. 1993.1111.
- Ganea, E., and Harding, J. J. (2006) Glutathione-related enzymes and the eye, *Curr. Eye Res.*, **31**, 1-11, doi: 10.1080/02713680500477347.
- Leske, M. C., Wu, S. Y., Hyman, L., Sperduto, R., Underwood, B., et al. (1995) Biochemical factors in the lens opacities. Case-control study. The Lens Opacities Case-Control Study Group, *Arch. Ophthalmol.*, **113**, 1113-1119, doi: 10.1001/archopht.1995.01100090039020.
- McCarty, C. A., and Taylor, H. R. (1996) Recent developments in vision research: light damage in cataract, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37, 1720-1723.
- McNeil, J. J., Robman, L., Tikellis, G., Sinclair, M. I., McCarty, C. A., et al. (2004) Vitamin E supplementation and cataract: randomized controlled trial, *Ophthalmology*, **111**, 75-84, doi: 10.1016/j.ophtha.2003.04.009.
- Wolf, N., Penn, P., Pendergrass, W., Van Remmen, H., Bartke, A., et al. (2005) Age-related cataract progression in five mouse models for anti-oxidant protection or hormonal influence, *Exp. Eye Res.*, 81, 276-285, doi: 10.1016/ j.exer.2005.01.024.
- 93. Horwitz, J., Huang, Q. L., Ding, L., and Bova, M. P. (1998) Lens alpha-crystallin: chaperone-like properties, *Methods Enzymol.*, **290**, 365-383, doi: 10.1016/s0076-6879(98)90032-5.
- 94. Horwitz, J. (2003) Alpha-crystallin, *Exp. Eye Res.*, **76**, 145-153, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00278-6.
- 95. Shang, F., and Taylor, A. (2004) Function of the ubiquitin proteolytic pathway in the eye, *Exp. Eye Res.*, **78**, 1-14, doi: 10.1016/j.exer.2003.10.003.
- 96. Zhang, X., Dudek, E. J., Liu, B., Ding, L., Fernandes, A. F., et al. (2007) Degradation of C-terminal truncated

alphaA-crystallins by the ubiquitin proteasome pathway, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 4200-4208, doi: 10.1167/iovs.07-0196.

- Ostadalova, I., Babicky, A., and Obenberger, J. (1978) Cataract induced by administration of a single dose of sodium selenite to suckling rats, *Experientia*, 34, 222-223, doi: 10.1007/BF01944690.
- Muranov, K., Poliansky, N., Winkler, R., Rieger, G., Schmut, O., et al. (2004) Protection by iodide of lens from selenite-induced cataract, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **242**, 146-151, doi: 10.1007/s00417-003-0790-x.
- Shang, F., Gong, X., and Taylor, A. (1997) Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated, *J. Biol. Chem.*, 272, 23086-23093, doi: 10.1074/jbc.272.37. 23086.
- 100. Shang, F., and Taylor, A. (1995) Oxidative stress and recovery from oxidative stress are associated with altered ubiquitin conjugating and proteolytic activities in bovine lens epithelial cells, *Biochem. J.*, **307**, 297-303, doi: 10.1042/ bj3070297.
- 101. Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449-10453, doi: 10.1073/pnas.89.21.10449.
- 102. Rao, P. V., Huang, Q. L., Horwitz, J., and Zigler, J. S., Jr. (1995) Evidence that alpha-crystallin prevents non-specific protein aggregation in the intact eye lens, *Biochim. Biophys. Acta*, **1245**, 439-447, doi: 10.1016/0304-4165(95)00125-5.
- Ryazantsev, S. N., Poliansky, N. B., Chebotareva, N. A., and Muranov, K. O. (2018) 3D structure of the native alphacrystallin from bovine eye lens, *Int. J. Biol. Macromol.*, 117, 1289-1298, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.004.
- 104. Horwitz, J., Bova, M. P., Ding, L. L., Haley, D. A., and Stewart, P. L. (1999) Lens alpha-crystallin: function and structure, *Eye*, **13**, 403-408, doi: 10.1038/eye.1999.114.
- 105. De Jong, W. W., Lubsen, N. H., and Kraft, H. J. (1994) Molecular evolution of the eye lens, *Prog. Retin. Eye Res.*, 12, 391-442, doi: 10.1016/1350-9462(94)90018-3.
- 106. Ma, Z., Hanson, S. R., Lampi, K. J., David, L. L., Smith, D. L., et al. (1998) Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry, *Exp. Eye Res.*, 67, 21-30, doi: 10.1006/exer.1998.0482.
- 107. Caspers, G. J., Leunissen, J. A., and de Jong, W. W. (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain", J. Mol. Evol., 40, 238-248, doi: 10.1007/ BF00163229.
- 108. De Jong, W. W., Caspers, G. J., and Leunissen, J. A. (1998) Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily, *Int. J. Biol. Macromol.*, **22**, 151-162, doi: 10.1016/s0141-8130(98)00013-0.
- 109. Kundu, M., Sen, P. C., and Das, K. P. (2007) Structure, stability, and chaperone function of alphaA-crystallin: role of *N*-terminal region, *Biopolymers*, **86**, 177-192, doi: 10.1002/bip.20716.
- Thampi, P., and Abraham, E. C. (2003) Influence of the Cterminal residues on oligomerization of alphaA-Crystallin, *Biochemistry*, 42, 11857-11863, doi: 10.1021/bi030129w.
- 111. Yang, C., Salerno, J. C., and Koretz, J. F. (2005) NH₂-terminal stabilization of small heat shock protein structure: a comparison of two NH₂-terminal deletion mutants of alphaA-crystallin, *Mol. Vis.*, **11**, 641-647.
- Sreelakshmi, Y., and Sharma, K. K. (2006) The interaction between alphaA- and alphaB-crystallin is sequence-specific, *Mol. Vis.*, **12**, 581-587.
- 113. Pasta, S. Y., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. (2004) The IXI/V motif in the C-terminal extension of

alpha-crystallins: Alternative interactions and oligomeric assemblies, *Mol. Vis.*, **10**, 655-662.

- 114. Vanhoudt, J., Abgar, S., Aerts, T., and Clauwaert, J. (2000) A small-angle X-ray solution scattering study of bovine alpha-crystallin, *Eur. J. Biochem.*, 267, 3848-3858, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01423.x.
- 115. Augusteyn, R. C., and Koretz, J. F. (1987) A possible structure for alpha-crystallin, *FEBS Lett.*, **222**, 1-5, doi: 10.1016/0014-5793(87)80180-1.
- 116. Groth-Vasselli, B., Kumosinski, T. F., and Farnsworth, P. N. (1995) Computer-generated model of the quaternary structure of alpha crystallin in the lens, *Exp. Eye Res.*, **61**, 249-253, doi: 10.1016/s0014-4835(05)80044-2.
- 117. Wistow, G. (1993) Possible tetramer-based quaternary structure for alpha-crystallins and small heat shock proteins, *Exp. Eye Res.*, **56**, 729-732, doi: 10.1006/exer. 1993.1090.
- 118. Walsh, M. T., Sen, A. C., and Chakrabarti, B. (1991) Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric alpha-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **266**, 20079-20084.
- 119. Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J., and Weinkauf, S. (2016) Structure and function of alpha-crystallins: traversing from *in vitro* to *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 149-166, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.06.008.
- 120. Kenworthy, A. K., Magid, A. D., Oliver, T. N., and McIntosh, T. J. (1994) Colloid osmotic pressure of steer alpha- and beta-crystallins: Possible functional roles for lens crystallin distribution and structural diversity, *Exp. Eye Res.*, **59**, 11-30, doi: 10.1006/exer.1994.1077.
- 121. Kramps, H. A., Stols, A. L., and Hoenders, H. J. (1975) On the quaternary structure of high-molecular-weight proteins from the bovine eye lens, *Eur. J. Biochem.*, **50**, 503-509, doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb09889.x.
- 122. Harding, J. J., and Dilley, K. J. (1976) Structural proteins of the mammalian lens: a review with emphasis on changes in development, aging and cataract, *Exp. Eye Res.*, **22**, 1-73, doi: 10.1016/0014-4835(76)90033-6.
- 123. Srivastava, O. P., Srivastava, K., and Silney, C. (1996) Levels of crystallin fragments and identification of their origin in water soluble high molecular weight (HMW) proteins of human lenses, *Curr. Eye Res.*, **15**, 511-520, doi: 10.3109/02713689609000762.
- 124. Krivandin, A. V., Muranov, K. O., Yakovlev, F. Y., Poliansky, N. B., Wasserman, L. A., et al. (2009) Resistance of alpha-crystallin quaternary structure to UV irradiation, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 633-642, doi: 10.1134/s0006297909060078.
- 125. Padgaonkar, V. A., Leverenz, V. R., Fowler, K. E., Reddy, V. N., and Giblin, F. J. (2000) The effects of hyperbaric oxygen on the crystallins of cultured rabbit lenses: a possible catalytic role for copper, *Exp. Eye Res.*, **71**, 371-383, doi: 10.1006/exer.2000.0887.
- 126. Carver, J. A., Nicholls, K. A., Aquilina, J. A., and Truscott, R. J. (1996) Age-related changes in bovine alpha-crystallin and high-molecular-weight protein, *Exp. Eye Res.*, 63, 639-647, doi: 10.1006/exer.1996.0158.
- 127. Takemoto, L., and Boyle, D. (1994) Molecular chaperone properties of the high molecular weight aggregate from aged lens, *Curr. Eye Res.*, **13**, 35-44, doi: 10.3109/ 02713689409042396.
- Liang, J. J., and Akhtar, N. J. (2000) Human lens highmolecular-weight alpha-crystallin aggregates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275, 354-359, doi: 10.1006/bbrc. 2000.3306.
- 129. Ganea, E., and Harding, J. J. (2000) Alpha-crystallin assists the renaturation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochem. J.*, **345**, 467-472.
- 130. Nath, D., Rawat, U., Anish, R., and Rao, M. (2002) Alpha-crystallin and ATP facilitate the *in vitro* renaturation

Protein Sci., **11**, 2727-2734, doi: 10.1110/ps.0213802. 131. Rachdan, D., Lou, M. F., and Harding, J. J. (2005) Glutathione reductase from human cataract lenses can be

Glutathione reductase from human cataract lenses can be revived by reducing agents and by a molecular chaperone, alpha-crystallin, *Curr. Eye Res.*, **30**, 919-925, doi: 10.1080/ 02713680590953110.

of xylanase: enhancement of refolding by metal ions,

- 132. Muranov, K. O., Poliansky, N. B., Chebotareva, N. A., Kleimenov, S. Y., Bugrova, A. E., et al. (2019) The mechanism of the interaction of alpha-crystallin and UV-damaged betaL-crystallin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **140**, 736-748, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.178.
- 133. Kurganov, B. I. (2002) Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 409-422, doi: 10.1023/ a:1015277805345.
- Kurganov, B. I. (2017) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones, *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 104-117, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.066.
- 135. Markossian, K. A., Kurganov, B. I., Levitsky, D. I., Khanova, H. A., Chebotareva, N. A., et al. (2006) in *Protein Folding: New Research* (Obalinsky, T. R., ed.) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 89-171.
- Kurganov, B. I. (2013) Antiaggregation activity of chaperones and its quantification, *Biochemistry (Moscow)*, 78, 1554-1566, doi: 10.1134/S0006297913130129.
- 137. Kurganov, B. I. (2013) How to quantify the chaperone-like (anti-aggregation) activity? *Biochem. Anal. Biochem.*, 2, e136, doi: 10.4172/2161-1009.1000e136.
- 138. Kurganov, B. I. (2013) Thermal denaturation and aggregation assays in analytical biochemistry, *Biochem. Anal. Biochem.*, 2, e143, doi: 10.4172/2161-1009. 1000e143.
- Kurganov, B. I. (2014) Estimation of chaperone-like activity using test systems based on protein amyloid aggregation, *Biochem. Anal. Biochem.*, 4, 160, doi: 10.4172/2161-1009.1000160.
- 140. Borzova, V. A., Markossian, K. A., Kara, D. A., Chebotareva, N. A., Makeeva, V. F., et al. (2013) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones: a test-system based on dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin, *PLoS One*, 8, e74367, doi: 10.1371/ journal.pone.0074367.
- 141. Augusteyn, R. C. (2004) Dissociation is not required for alpha-crystallin's chaperone function, *Exp. Eye Res.*, 79, 781-784, doi: 10.1016/j.exer.2004.08.010.
- 142. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Borzova, V. A., Yudin, I. K., et al. (2018) Mechanism of aggregation of UV-irradiated glycogen phosphorylase *b* at a low temperature in the presence of crowders and trimethylamine N-oxide, *Biophys. Chem.*, 232, 12-21, doi: 10.1016/ j.bpc.2017.10.001.
- 143. Chebotareva, N. A., Filippov, D. O., and Kurganov, B. I. (2015) Effect of crowding on several stages of protein aggregation in test systems in the presence of α -crystallin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **80**, 358-365, doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2015.07.002.
- 144. Roman, S. G., Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Kleymenov, S. Y., Makeeva, V. F., et al. (2011) Does the crowded cell-like environment reduce the chaperone-like activity of α-crystallin? *Biochemistry*, **50**, 10607-10623, doi: 10.1021/bi201030y.
- 145. Kurganov, B. I., and Chebotareva, N. A. (2013) The functioning of chaperones possessing the anti-aggregation activity in a crowded medium, *Biochem. Anal. Biochem.*, **2**, e138, doi: 10.4172/2161-1009.1000e138.
- 146. Derham, B. K., and Harding, J. J. (1997) Effect of aging on the chaperone-like function of human alpha-crystallin

assessed by three methods, *Biochem. J.*, **328**, 763-768, doi: 10.1042/bj3280763.

- 147. Derham, B. K., and Harding, J. J. (1997) The effects of ageing on the chaperone-like function of rabbit alpha-crystallin, comparing three methods of assay, *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 187-194, doi: 10.1016/s0304-4165(97)00029-9.
- 148. Fujii, N., Takata, T., Kim, I., Morishima, K., Inoue, R., et al. (2020) Asp isomerization increases aggregation of alpha-crystallin and decreases its chaperone activity in human lens of various ages, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1868**, 140446, doi: 10.1016/j.bbapap.2020. 140446.
- 149. Huang, F. Y., Ho, Y., Shaw, T. S., and Chuang, S. A. (2000) Functional and structural studies of alpha-crystallin from galactosemic rat lenses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 197-202, doi: 10.1006/bbrc.2000.2924.
- Kumar, P. A., Suryanarayana, P., Reddy, P. Y., and Reddy, G. B. (2005) Modulation of alpha-crystallin chaperone activity in diabetic rat lens by curcumin, *Mol. Vis.*, 11, 561-568.
- 151. Inomata, M., Nomura, K., Takehana, M., Saido, T. C., Kawashima, S., et al. (1997) Evidence for the involvement of calpain in cataractogenesis in Shumiya cataract rat (SCR), *Biochim. Biophys. Acta*, **1362**, 11-23, doi: 10.1016/s0925-4439(97)00050-1.
- 152. Nandi, S. K., Nahomi, R. B., Rankenberg, J., Glomb, M. A., and Nagaraj, R. H. (2020) Glycation-mediated inter-protein cross-linking is promoted by chaperoneclient complexes of α-crystallin: Implications for lens aging and presbyopia, J. Biol. Chem., 295, 5701-5716, doi: 10.1074/jbc.RA120.012604.
- 153. Brennan, L. A., Lee, W., Giblin, F. J., David, L. L., and Kantorow, M. (2009) Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) restores alpha-crystallin chaperone activity lost upon methionine oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1665-1672, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.08.011.
- 154. Moschini, R., Marini, I., Malerba, M., Cappiello, M., Del, C. A., et al. (2006) Chaperone-like activity of alphacrystallin toward aldose reductase oxidatively stressed by copper ion, *Arch. Biochem. Biophys.*, **453**, 13-17, doi: 10.1016/j.abb.2006.03.008.
- 155. Van Boekel, M. A., Hoogakker, S. E., Harding, J. J., and de Jong, W. W. (1996) The influence of some post-translational modifications on the chaperone-like activity of alphacrystallin, *Ophthalmic Res.*, **28 Suppl 1**, 32-38, doi: 10.1159/000267940.
- 156. Sharma, K. K., and Ortwerth, B. J. (1995) Effect of crosslinking on the chaperone-like function of alpha crystallin, *Exp. Eye Res.*, **61**, 413-421, doi: 10.1016/s0014-4835(05)80136-8.
- 157. Borzova, V. A., Markossian, K. A., Muranov, K. O., Polyansky, N. B., Kleymenov, S. Y., et al. (2015) Quantification of anti-aggregation activity of UV-irradiated alpha-crystallin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **73**, 84-91, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.060.
- 158. Schmid, P. W. N., Lim, N. C. H., Peters, C., Back, K. C., Bourgeois, B., et al. (2021) Imbalances in the eye lens proteome are linked to cataract formation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 28, 143-151, doi: 10.1038/s41594-020-00543-9.
- Clark, J. I., and Huang, Q. L. (1996) Modulation of the chaperone-like activity of bovine alpha-crystallin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 15185-15189, doi: 10.1073/pnas. 93.26.15185.
- Clark, J. I., Livesey, J. C., and Steele, J. E. (1996) Delay or inhibition of rat lens opacification using pantethine and WR-77913, *Exp. Eye Res.*, 62, 75-84, doi: 10.1006/exer. 1996.0009.
- Hiraoka, T., Clark, J. I., LI, X. Y., and Thurston, G. M. (1996) Effect of selected anti-cataract agents on opacifica-

tion in the selenite cataract model, *Exp. Eye Res.*, **62**, 11-19, doi: 10.1006/exer.1996.0002.

- 162. Hiraoka, T., and Clark, J. I. (1995) Inhibition of lens opacification during the early stages of cataract formation., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36, 2550-2555.
- 163. Santhoshkumar, P., and Sharma, K. K. (2002) Identification of a region in alcohol dehydrogenase that binds to alpha-crystallin during chaperone action, *Biochim. Biophys. Acta*, **1598**, 115-121, doi: 10.1016/s0167-4838(02)00356-4.
- 164. Sharma, K. K., Kumar, R. S., Kumar, G. S., and Quinn, P. T. (2000) Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in alphaA-crystallin, *J. Biol. Chem.*, 275, 3767-3771, doi: 10.1074/jbc.275.6.3767.
- 165. Sreelakshmi, Y., and Sharma, K. K. (2001) Interaction of alpha-lactalbumin with mini-alphaA-crystallin, J. Protein Chem., 20, 123-130, doi: 10.1023/a:1011077307262.
- 166. Srinivas, V., Raman, B., Rao, K. S., Ramakrishna, T., and Rao, C. (2005) Arginine hydrochloride enhances the dynamics of subunit assembly and the chaperone-like activity of alpha-crystallin, *Mol. Vis.*, **11**, 249-255.
- 167. Viner, R. I., and Clegg, J. S. (2001) Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/alpha-crystallin protein, *Cell Stress. Chaperones*, 6, 126-135, doi: 10.1379/1466-1268(2001)006<0126:iototm>2.0. co;2.
- 168. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kleymenov, S. Y., et al. (2020) Effect of arginine on stability and aggregation of muscle glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **165**, 365-374, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.101.
- 169. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Sluchanko, N. N., et al. (2019) Comparative effects of trehalose and 2-hydroxypropyl-OI-cyclodextrin on aggregation of UV-irradiated muscle glycogen phosphorylase b, Biochimie, 165, 196-205, doi: 10.1016/ j.biochi.2019.08.006.
- 170. Muranov, K. O., Dizhevskaya, A. K., Poliansky, N. B., Dodonova, S. O., and Ostrovsky, M. A. (2010) Short-chain peptides as a promising class of chaperone-like anticataract agents: Molecular mechanism of inhibition of crystallin aggregation by pantethine, *Rus. Chem. Bull.*, **59**, 225-231, doi: 10.1007/s11172-010-0066-7.
- 171. Dizhevskaya, A. K., Muranov, K. O., Boldyrev, A. A., and Ostrovsky, M. A. (2012) Natural dipeptides as mini-chaperones: Molecular mechanism of inhibition of lens betaLcrystallin aggregation, *Curr. Aging Sci.*, 5, 236-241, doi: 10.2174/1874609811205030011.
- 172. Avetisov, S. E., Polunin, G. S., Sheremet, N. L., Makarov, I. A., Fedorov, A. A., et al. (2008) Chaperon-like anticataract agents, the antiaggregants of lens crystallin. Communication 4. Study of the effect of a mixture of diand tetrapeptides on a prolonged rat model of UV-induced cataract, *Vestn. Oftalmol.*, **124**, 12-16.
- 173. Avetisov, S. E., Polunin, G. S., Sheremet, N. L., Muranov, K. O., Makarov, I. A., et al. (2008) Search for chaperonlike anticataract agents, the antiaggregants of lens crystallin. Communication 3. Possibilities of a follow-up of caractogenesis processes on a prolonged rat model of UVinduced cataract, *Vestn. Oftalmol.*, **124**, 8-12.
- 174. Muranov, K. O., Dizhevskaia, A. K., Boldyrev, A. A., Karpova, O. E., Sheremet, N. L., et al. (2008) Search for chaperon-like anticataract drugs, the antiaggregants of lens crystallins. Communication. 1. Chaperon-like activity of N-acetyl carnosine dipeptide: *in vitro* study on a model of ultraviolet-induced aggregation of betaL-crystallin, *Vestn. Oftalmol.*, **124**, 3-6.
- 175. Soustov, L. V., Chelnokov, E. V., Sapogova, N. V., Bitiurin, N. M., Nemov, V. V., et al. (2008) Like anticataract agents,

the antiaggregants of lens crystallin. Communication 2. Study of the impact of chaperon-like (protective) activity of short-chain peptides on the rate of UV-induced aggregation of betaL-crystallins by eximer laser, *Vestn. Oftalmol.*, **124**, 6-8.

- 176. Makley, L. N., McMenimen, K. A., DeVree, B. T., Goldman, J. W., McGlasson, B. N., et al. (2015) Pharmacological chaperone for alpha-crystallin partially restores transparency in cataract models, *Science*, **350**, 674-677, doi: 10.1126/science.aac9145.
- 177. Zhao, L., Chen, X. J., Zhu, J., Xi, Y. B., Yang, X., et al. (2015) Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts, *Nature*, **523**, 607-611, doi: 10.1038/nature14650.
- 178. Hejtmancik, J. F. (2015) Ophthalmology: cataracts dissolved, *Nature*, **523**, 540-541, doi: 10.1038/nature14629.
- 179. Quinlan, R. A. (2015) Drug discovery. A new dawn for cataracts, *Science*, **350**, 636-637, doi: 10.1126/science. aad6303.
- 180. Daszynski, D. M., Santhoshkumar, P., Phadte, A. S., Sharma, K. K., Zhong, H. A., et al. (2019) Failure of oxysterols such as lanosterol to restore lens clarity from cataracts, *Sci. Rep.*, **9**, 8459, doi: 10.1038/s41598-019-44676-4.
- 181. Huang, C., Li, C., and Muhemaitia, P. (2019) Impediment of selenite-induced cataract in rats by combinatorial drug laden liposomal preparation, *Libyan. J. Med.*, 14, 1548252, doi: 10.1080/19932820.2018.1548252.
- 182. Nagai, N., Fukuoka, Y., Sato, K., Otake, H., Taga, A., et al. (2020) The intravitreal injection of lanosterol nanoparticles rescues lens structure collapse at an early stage in Shumiya cataract rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1048, doi: 10.3390/ijms21031048.
- 183. Shen, X., Zhu, M., Kang, L., Tu, Y., Li, L., et al. (2018) Lanosterol synthase pathway alleviates lens opacity in agerelated cortical cataract, *J. Ophthalmol.*, **2018**, 4125893, doi: 10.1155/2018/4125893.
- 184. Gupta, S. K., Selvan, V. K., Agrawal, S. S., and Saxena, R. (2009) Advances in pharmacological strategies for the prevention of cataract development, *Indian J. Ophthalmol.*, 57, 175-183, doi: 10.4103/0301-4738.49390.

- 185. Ciuffi, M., Neri, S., Franchi-Micheli, S., Failli, P., Zilletti, L., et al. (1999) Protective effect of pirenoxine and U74389F on induced lipid peroxidation in mammalian lenses. An *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* study, *Exp. Eye Res.*, **68**, 347-359, doi: 10.1006/exer.1998.0612.
- 186. Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of highdose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9, Arch. Ophthalmol., 119, 1439-1452, doi: 10.1001/archopht.119.10.1439.
- 187. Sekimoto, M., Imanaka, Y., Kitano, N., Ishizaki, T., and Takahashi, O. (2006) Why are physicians not persuaded by scientific evidence? A grounded theory interview study, *BMC. Health Serv. Res.*, 6, 1-9, doi: 10.1186/1472-6963-6-92.
- 188. Datiles, M. B., III, Ansari, R. R., Suh, K. I., Vitale, S., Reed, G. F., et al. (2008) Clinical detection of precataractous lens protein changes using dynamic light scattering, *Arch. Ophthalmol.*, **126**, 1687-1693, doi: 10.1001/ archophthalmol.2008.507.
- Ansari, R. R. (2004) Ocular static and dynamic light scattering: a noninvasive diagnostic tool for eye research and clinical practice, *J. Biomed. Opt.*, 9, 22-37, doi: 10.1117/ 1.1626663.
- 190. Datiles, M. B., III, Ansari, R. R., and Reed, G. F. (2002) A clinical study of the human lens with a dynamic light scattering device, *Exp. Eye Res.*, 74, 93-102, doi: 10.1006/ exer.2001.1106.
- 191. Ansari, R. R., Suh, K. I., Dunker, S., Kitaya, N., and Sebag, J. (2001) Quantitative molecular characterization of bovine vitreous and lens with non-invasive dynamic light scattering, *Exp. Eye Res.*, **73**, 859-866, doi: 10.1006/ exer.2001.1097.
- 192. Datiles, M. B., III, Ansari, R. R., Yoshida, J., Brown, H., Zambrano, A. I., et al. (2016) Longitudinal study of agerelated cataract using dynamic light scattering: Loss of alpha-crystallin leads to nuclear cataract development, *Ophthalmology*, **123**, 248-254, doi: 10.1016/j.ophtha. 2015.10.007.

BIOCHEMISTRY OF LENS: NORM AND CATARACTOGENESIS

Review

K. O. Muranov* and M. A. Ostrovsky

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail k.muranov@sky.chph.ras.ru

The absence of cellular organelles in fiber cells, very high protein concentration (up to 900 mg/ml) in the cytoplasm minimize light scattering in the lens and ensure its transparency. Low oxygen concentration, powerful defense systems (antioxidants, antioxidant enzymes, chaperone-like protein alpha-crystallin, etc.) maintain the lens transparency. In contrast, the ability of crystallins to accumulate post-translational modifications with age, which reduces the resistance of proteins to oxidative stress, is an important factor contributing to the cataract's formation. Authors suggest a single mechanism of cataractogenesis. The cataractogenic factors like age, radiation, ultraviolet, diabetic, etc. cause damage and death of the lens epithelium. As a result, oxygen penetrates the lens through the formed defects of the epithelial layer that causes oxidative damage to the crystallins. In consequence of the damage the proteins denature, aggregate and form the so-called multilamellar bodies, which are the main cause of lens opacity. The review discusses es various approaches to inhibiting of opacity (cataracts) development, in particular the use of a combination of antioxidants and compounds that enhance the chaperone-like properties of alpha-crystallin. The paradox is associated with the too late use of the drug, when the opacity has already formed. The way we can get out of this situation is to develop new diagnostic methods that would make it possible to predict the occurrence of cataracts long before the manifestation of clinical signs of the disease and stimulate early preventive treatment.

Keywords: lens, cataract, pathogenesis, crystallins, small heat shock proteins, anti-cataract drugs

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ ТРЕГАЛОЗЫ НА ОЛИГОМЕРНОЕ СОСТОЯНИЕ И ΑΗΤИΑΓΡΕΓΑШИОННУЮ ΑΚΤИВНОСТЬ αΒ-ΚΡИСТАЛЛИНА

© 2022 Н.А. Чеботарева*, Т.Б. Еронина, В.В. Михайлова, С.Г. Роман, К.В. Тугаева, Б.И. Курганов

Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: n.a.chebotareva@gmail.com

> Поступила в редакцию 20.09.2021 После доработки 21.10.2021 Принята к публикации 22.10.2021

αВ-Кристаллин (αВ-Сг), один из главных белков хрусталика глаза, вместе с другими кристаллинами поддерживает прозрачность хрусталика, предотвращая агрегацию белков и, таким образом, защищая глаз от катаракты. αВ-Сг относится к классу молекулярных шаперонов, он широко экспрессируется во многих тканях и имеет динамичную четвертичную структуру, которая необходима для проявления шапероноподобной активности. Сдвиг в равновесии ансамблей олигомеров *а*B-Cr с различным числом субъединиц позволяет регулировать активность шаперона. Известно, что трегалоза ингибирует агрегацию белков in vivo и in vitro и широко используется в биотехнологии. Результаты изучения влияния трегалозы на шапероноподобную активность кристаллинов могут послужить основой для создания препаратов, способствующих замедлению катарактогенеза. В настоящей работе мы исследовали влияние трегалозы на четвертичную структуру и антиагрегационную активность α B-Cr с использованием мышечной гликогенфосфорилазы b (Φ E) в качестве модельного белка-мишени. По данным динамического светорассеяния, трегалоза влияет на процесс тепловой агрегации ФБ при 48 °C преимущественно на стадии нуклеации, причем в присутствии белкового шаперона основной эффект трегалозы связан с увеличением адсорбционной емкости (AC₀) αB-Cr (для 66 мМ трегалозы увеличение АС₀ является 1,5-кратным). По данным седиментационного анализа, трегалоза стабилизирует димерную форму ФБ на стадии диссоциации и денатурации ФБ и усиливает взаимодействие αB-Cr с белком-мишенью. Кроме того, трегалоза сдвигает равновесие между олигомерными формами αB-Cr в сторону образования малых олигомерных форм. Таким образом, трегалоза оказывает влияние на четвертичную структуру αB-Cr и увеличивает его антиагрегационную активность на стадии нуклеации процесса агрегации белка-мишени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: αВ-кристаллин, антиагрегационная активность, трегалоза, гликогенфосфорилаза b, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование.

DOI: 10.31857/S032097252202004X

ВВЕДЕНИЕ

Денатурация и агрегация белков, входящих в состав хрусталика, приводит к образованию крупных светорассеивающих агрегатов и потере прозрачности хрусталика – катаракте [1]. Катарактогенез очень часто обусловлен естественными возрастными изменениями. Единственным эффективным методом лечения катаракты в настоящее время является замена помутневшего хрусталика на искусственную линзу, поэтому понимание механизмов катарактогенеза и поиск веществ, способных замедлить этот процесс, является актуальной и социально значимой проблемой.

Кристаллины, α-, β-, γ-, составляют более 90% растворимых белков, входящих в состав хрусталика глаза [2, 3], и обеспечивают его прозрачность. Концентрация белков в хрусталике глаза очень высокая, у человека она достигает 450 мг/мл [4]. В течение жизни белки хрусталика не обновляются, поэтому в процессе старения в них накапливаются посттрансляционные изменения, которые могут приводить к их денатурации и агрегации. Зависимое от возраста снижение растворимости кристаллинов и их агрегация являются патологическими признаками катаракты.

α-Кристаллин, гетероолигомер, состоящий из αА- и αВ-кристаллинов, принадлежит к классу молекулярных шаперонов и является одним из главных белков хрусталика, обладающих шапероноподобной функцией. α-Кристаллин связывается с поврежденными белками и поддерживает их растворимость, препятствуя агре-

Принятые сокращения: ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние; ФБ – гликогенфосфорилаза *b*; AUC – аналитическое ультрацентрифугирование; SV – скоростная седиментация; αB -Cr – αB -кристаллин.

^{*} Адресат для корреспонденции.

гации [5–9], в том числе предотвращает нежелательную агрегацию кристаллинов и развитие катаракты [10].

αВ-Кристаллин (αВ-Сг) широко экспрессируется во многих тканях и имеет динамичную четвертичную структуру, которая позволяет ему образовывать in vitro полидисперсные ансамбли обменивающихся субъединицами олигомеров, шапероноподобной обладающих активностью [11]. Подвижное равновесие между разными олигомерными формами αB-Cr очень чувствительно к факторам внешней среды: температуре, присутствию ионов, условиям краудинга и др. [12–18]. В современных моделях шапероноподобной активности *а*В-Сг сдвиг равновесия в ансамбле олигомеров позволяет регулировать активность шаперона, в результате чего олигомеры малого размера (мономер и димер) обычно являются более активными формами [5, 11, 14]. Существует предположение, что симметричные олигомерные комплексы высшего порядка могут использоваться для хранения, тогда как формы, способные к связыванию развернутых белков, представляют собой либо более мелкие комплексы (возможно, димеры), либо неполные сферы, дающие место для связывания белков-клиентов [5, 11]. Однако остается много неясного в вопросе о том, как функционирует αB-Cr в хрусталике в условиях краудинга, и какую роль играют разные олигомерные формы αВ-Сг. Кроме того, известно, что структурные изменения, мутации и дисфункция самого αB-Cr также связаны с некоторыми видами катаракты [9, 10, 19-24].

Считается, что образование аморфных агрегатов — это быстрый путь формирования катаракты, а образование амилоидных фибрилл связывается с медленным развитием катаракты [10]. α B-Cr ингибирует оба типа агрегации [25]. Однако механизмы действия *а*B-Cr in vitro при образовании аморфных агрегатов или амилоидных фибрилл проявляют существенные различия [26]. Агрегация самого αB-Cr также может приводить к образованию как аморфных агрегатов, так и амилоидоподобных структур. В условиях краудинга происходит изменение конформации, олигомерного состояния и увеличение размера αB-Cr [10, 16], уменьшение его тепловой стабильности и антиагрегационной активности [10, 27], при этом αB-Cr способен образовывать кинетически различные аморфные и фибриллярные агрегаты [10]. Интересно отметить, что α-кристаллин сохраняет шаперонную активность и при образовании амилоидных фибрилл [28].

Одним из вариантов терапевтического лечения катаракты является использование малых

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

молекул для стабилизации нативного состояния кристаллинов [29]. Было обнаружено, что присутствие амилоидоподобных структур в белковых агрегатах хрусталика, индуцированных нагреванием, значительно снижается в присутствии трегалозы [30]. Трегалоза является природным осмолитом и стабилизирует белки при всевозможных стрессах (тепловом, осмотическом, высыхании и др.); поэтому ее называют химическим шапероном [31, 32].

Авторы работы [30] показали, что трегалоза значительно уменьшает агрегацию растворимых белков хрусталика, вызванную нагреванием в течение 4 ч при 55 °С. При высоких концентрациях трегалозы (30% w/v) количество нерастворимых агрегатов уменьшается вдвое, однако полного подавления процесса агрегации в присутствии трегалозы не происходит. Известно, что трегалоза вызывает преимущественную гидратацию поверхности белка, тем самым препятствуя его разворачиванию и агрегации [30]. Такое свойство трегалозы может быть полезно для отсрочки возникновения катаракты. Показано, что трегалозу можно использовать в глазных каплях для защиты эпителия роговицы от сухости, вызванной синдромом сухого глаза [33]. В биотехнологии и фармацевтике трегалоза широко используется благодаря своей нетоксичности и высокой растворимости в воде.

Для выяснения молекулярных механизмов катарактогенеза необходимо понимать, как осмолиты, такие как трегалоза, влияют на шаперонную активность кристаллинов. Было обнаружено, что трегалоза стабилизирует нативную структуру α -кристаллина, ингибирует его агрегацию и дезагрегирует ранее сформированные низкомолекулярные агрегаты, но не влияет на его шапероноподобную активность [34].

В настоящей работе мы исследовали влияние трегалозы на шапероноподобную активность α B-Cr. Для этой цели была выбрана тестсистема, основанная на тепловой агрегации мышечной гликогенфосфорилазы *b* (ФБ) при 48 °C. Эта тест-система была охарактеризована нами ранее, и для нее было показано, что скоростьлимитирующей стадией процесса агрегации на этапе роста агрегатов является диссоциация димера ФБ на мономеры [27, 35].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ФБ. ФБ выделяли из скелетных мышц кролика, как описано ранее [36], и хранили в 0,04 М β-глицерофосфатном буфере, рН 6,8, содержащем 0,03 М β-меркаптоэтанол и 50%-ный раствор глицерина, при –20 °С. Перед

экспериментом раствор ФБ был пропущен через колонку с Сефадексом (Sephadex G-15), уравновешенную с 0,03 М НЕРЕЅ, рН 6,8, содержащим 0,1 М NaCl. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием коэффициента поглощения $A_{cm}^{1\%}$ 13,2 [37].

Выделение αB-Cr (HspB5). Кодирующая последовательность HspB5 человека была клонирована в векторе pET23 для экспрессии в клетках *E. coli* как описано в работе [38]. Сверхэкспрессированный HspB5 очищали с помощью высаливания сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией. Наиболее чистые фракции по электрофорезу в присутствии додецилсульфата натрия объединяли, концентрировали, разделяли на аликвоты и хранили при –80 °C.

Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС). При исследовании кинетики агрегации белков рассеивающийся под углом 90° свет He-Ne лазера («Coherent», США, Model 31-2082, 632,8 нм, 10 мВ) анализировали с использованием коммерческого прибора Photocor Complex («Photocor Instruments, Inc.», США). Полидисперсный анализ данных ДЛС проводили с помощью программы DYNALS («Alango», Израиль). Кинетику агрегации ФБ при 48 °С изучали в 0,03 M HEPES, pH 6,8, содержащем 0,15 M NaCl и 0,5 мМ дитиотреитол (ДТТ), в цилиндрической кювете с внутренним диаметром 6,3 мм. Процесс агрегации ФБ запускали добавлением белка до концентрации 0,3 мг/мл в предварительно прогретую в течение 5 мин при 48 °C кювету, содержащую буфер. Для изучения эффектов трегалозы, аВ-Сг и их смесей эти вещества также инкубировали в кювете в течение 5 мин при 48 °C перед началом эксперимента.

Определение адсорбционной емкости шаперона на разных стадиях агрегации белка-мишени. Антиагрегационная активность белкового шаперона α B-Cr может быть охарактеризована величиной его начальной адсорбционной емкости (AC₀) [39–41], которая показывает, сколько молекул белка-мишени связывается одной молекулой шаперона.

Стадия нуклеации описывается уравнением [39, 40, 42]:

$$I - I_0 = K_{\text{agg}}(t - t_0)^2, \ (t > t_0), \tag{1}$$

где I – интенсивность светорассеяния, t – время, I_0 – начальное значение интенсивности светорассеяния при t = 0, t_0 – момент времени, в который регистрируется начальное приращение интенсивности светорассеяния, т.е. лаг-период на кинетических кривых агрегации ФБ, и K_{agg} – параметр, характеризующий ускорение процесса агрегации на стадии нуклеации. На этой стадии значение AC_0 может быть определено как величина, обратная длине отрезка, отсекаемого на оси абсцисс начальным линейным участком зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от отношения молярных концентраций [α B-Cr]/[Φ Б], где K_{agg} и $K_{agg,0}$ – значения параметров, полученные в присутствии и в отсутствие шаперона соответственно.

Начальный участок процесса агрегации на стадии роста белковых агрегатов описывается уравнением [43]:

$$I - I_0 = v_0(t - t^*) - B(t - t^*)^2, \ (t > t^*),$$
(2)

где v_0 — начальная скорость процесса агрегации на стадии роста агрегатов, t^* — длительность стадии нуклеации, определяемая отрезком на оси абсцисс, отсекаемым теоретической кривой, рассчитанной из этого уравнения при $I - I_0 = 0$, и B — константа. На стадии роста белковых агрегатов для определения AC₀ может быть использовано предложенное ранее уравнение [41]:

$$v_0 = v_0^{(0)} (1 - AC_0 x), \tag{3}$$

где x — отношение молярной концентрации α B-Cr, рассчитанной на субъединицу белка с молекулярной массой 20 кДа, к молярной концентрации Φ Б, рассчитанной на мономер с молекулярной массой 97,4 кДа ($x = [\alpha B-Cr]/[\Phi B]$), и $v_0^{(0)}$ — значение v_0 при x = 0. АС₀ определяется как величина, обратная величине отрезка, отсекаемого на оси абсцисс начальным линейным участком зависимости $v_0/v_0^{(0)}$ от отношения [α B-Cr]/[Φ Б].

Отметим, что адсорбционная емкость α B-Cr, рассчитанная из начального участка зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от отношения [α B-Cr]/[Φ Б] или зависимости $v_0/v_0^{(0)}$ от отношения [α B-Cr]/[Φ Б], характеризует максимальную адсорбционную емкость α B-Cr, которая реализуется при избытке белка-мишени.

Определение антиагрегационной активности химического шаперона на разных стадиях агрегации белка-мишени. В случае химических шаперонов, которые обратимо связываются с белком-мишенью, антиагрегационная активность шаперона может быть охарактеризована его концентрацией полунасыщения [L]_{0.5}, которая рассчитывается по формулам, аналогичным уравнению Хилла [44]. На стадии нуклеации использована формула:

$$K_{\text{agg}}/K_{\text{agg},0} = 1/\{1 + ([L]/[L]_{0.5})^h\},$$
 (4)

а на стадии роста агрегатов – формула:

$$v_0/v_0^{(0)} = 1/\{1 + ([L]/[L]_{0.5})^h\},$$
 (5)

где [L] – молярная концентрация химического шаперона, [L]_{0.5} – значение [L], при котором $K_{agg}/K_{agg,0} = 0,5$ или $v_0/v_0^{(0)} = 0,5$, и h – коэффициент Хилла.

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC). Эксперименты по скоростной седиментации (SV) проводили в аналитической ультрацентрифуге, модель Е («Весктал», США), оснащенной абсорбционной оптикой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером в режиме онлайн. В опытах использовали титановый ротор An-F Ti и двухсекторные ячейки. Седиментационные профили регистрировали путем измерения оптической плотности при 280 нм. Все ячейки сканировали одновременно с интервалом в 2,5 мин. Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации [c(s)] в зависимости от коэффициента седиментации s] были определены и приведены к стандартным условиям (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °C) с помощью программы SEDFIT [45].

SV-опыты выполняли в 0,03 М HEPES-буфере, pH 6,8, содержащем 0,15 М NaCl. Все образцы, если не указано иначе, предварительно инкубировали в термостате в течение 3 ч при 48 °C, затем охлаждали 2 мин в воде со льдом, вносили в ячейки и проводили опыт при 20 °C. Часть опытов SV проведена при 48 °C. Перед этими опытами ротор предварительно выдерживали в термостате при 48 °C в течение ночи.

Значения плотности и динамической вязкости растворов 350 мМ трегалозы в 0,03 М НЕРЕЅ, pH 6,8, содержащем 0,15 М NaCl, использованных в опытах AUC, были измерены непосредственно при 48 °C и 20 °C. Плотность растворов измерена в денситометре DMA 4500 («Anton Paar», Австрия) и определена равной 1,0408 и 1,0536 г/см³ для растворов 350 мМ трегалозы при 48 °C и 20 °C соответственно. Динамическую вязкость растворов определяли на автоматическом микровискозиметре AMVn («Anton Paar») в капиллярной системе 1,6/1,5 мм. Динамическая вязкость растворов 350 мМ трегалозы равна 0,8156 и 1,5218 (мПа·с) при 48 °C и 20 °C соответственно.

Анализ данных. Для вычислений использовали программу Origin Pro 2017 («Origin Lab Corp.», США). Для характеристики степени соответствия между экспериментальными данными и расчетными значениями мы использовали коэффициент детерминации R^2 как описано в работе [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние трегалозы на агрегацию ФБ в присутствии α B-Cr. На рис. 1 изображены кинетические кривые агрегации ФБ, регистрируемые методом ДЛС при 48 °С в присутствии различных концентраций α B-Cr в отсутствие (рис. 1, *a*) и в присутствии 66 мМ трегалозы (рис. 1, *б*).

Используя уравнение (1), можно оценить основные параметры стадии нуклеации t_0 и K_{agg} . Чтобы оценить на этой стадии значения AC₀ для α B-Cr по отношению к ФБ в отсутствие (кривая *1* на рис. 2, *a*) и в присутствии 66 мМ трегалозы (кривая *2* на рис. 2, *a*), были построены графики зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от [α B-Cr]/[ФБ]. Показано, что на стадии нуклеации трегалоза в концентрации 66 мМ в 1,5 раза увеличивает адсорбционную емкость α B-Cr (табл. 1).

Из рис. 2, δ (вставка) видно, что прирост величины $t_0/t_0^{(0)}$ с ростом концентрации α B-Cr становится более заметным в присутствии 66 мМ трегалозы.

С использованием уравнения (2) были оценены основные параметры процесса агрегации



Puc. 1. Влияние αВ-Сг на кинетику агрегации ФБ (0,3 мг/мл; 0,03 М НЕРЕЅ, 0,15 М NaCl, 0,5 мМ ДТТ, pH 6,8) при 48 °C в отсутствие (*a*) и в присутствии 66 мМ трегалозы (*б*). Зависимости интенсивности светорассеяния ($I - I_0$) от времени, полученные при следующих концентрациях αВ-Сг: (*a*) (*I*) 0, (*2*) 0,0025, (*3*) 0,03, (*4*) 0,05, (*5*) 0,075, (*6*) 0,1 и (*7*) 0,2 мг/мл; (*б*) (*I*) ФБ без добавок, (*2*) 0, (*3*) 0,0025, (*4*) 0,01, (*5*) 0,03 и (*6*) 0,05 мг/мл

Marman rei maman au	Эффективность действия шаперона			
изучаемый шаперон	стадия нуклеации	стадия роста агрегатов		
αB-Cr	$AC_0 = 2,04 \pm 0,04 \ \Phi B$ мономер на 1 субъединицу αB -Cr	AC ₀ = 1,96 ± 0,04 ФБ мономер на 1 субъединицу <i>а</i> B-Cr		
αВ-Сг в присутствии 66 мМ трегалозы	$AC_0 = 2,94 \pm 0,08 \ \Phi B$ мономер на 1 субъединицу αB -Cr	$AC_0 = 2,00 \pm 0,04 \ \Phi B$ мономер на 1 субъединицу αB -Cr		
Трегалоза	$[L]_{0.5} = 86.2 \pm 1.4 \text{ MM}$	$[L]_{0.5} = 85,3 \pm 4,1 \text{ MM}$		
Трегалоза в присутствии αB-Cr (0,015 мг/мл)	$[L]_{0.5} = 67,0 \pm 4,0 \text{ MM}$	[L] _{0.5} = 86,6 ± 5,0 мМ		

Таблица 1. Параметры, характеризующие влияние трегалозы на агрегацию ФБ (0,3 мг/мл) при 48 °С

ФБ, а именно длительность стадии нуклеации (t^*) и начальная скорость процесса агрегации на стадии роста агрегатов (v_0) . Чтобы оценить значения AC₀ для α B-Cr по отношению к ФБ на стадии роста агрегатов в отсутствие (кривая *1* на рис. 2, *в*) и в присутствии 66 мМ трегалозы (кривая *2* на рис. 2, *в*), были построены графики зависимостей $v_0/v_0^{(0)}$ от отношения [α B-Cr]/[ФБ]. Показано, что трегалоза в концентрации 66 мМ

практически не влияет на величину AC_0 на стадии роста агрегатов (рис. 2, *в*; табл. 1). Из рис. 2, *г* (вставка) видно, что прирост величины $t^*/t^{*(0)}$ с ростом концентрации α B-Cr не меняется в присутствии 66 мМ трегалозы.

Влияние αВ-Сг на агрегацию ФБ в присутствии трегалозы. На рис. 3 представлены кинетические кривые агрегации ФБ (0,3 мг/мл), регистрируемые методом ДЛС, при 48 °С в присут-



Рис. 2. Влияние α B-Cr на кинетические параметры агрегации Φ Б (0,3 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 66 мМ трегалозы при 48 °C. Зависимости относительного ускорения процесса агрегации на стадии нуклеации ($K_{agg}/K_{agg,0}$) (*a*), значений лаг-периодов (t_0) на кинетических кривых агрегации Φ Б (δ), относительной начальной скорости агрегации ($v_0/v_0^{(0)}$) на стадии роста агрегатов (s) и значений длительности стадии нуклеации (t^*) (c) от отношения молярных концентраций α B-Cr и Φ Б. Кривые 1 (\bigcirc) и 2 (\Box) на рисунках a, δ , s и c получены в отсутствие и в присутствии 66 мМ трегалозы соответственно. На вставках на рис. 2, δ и c изображены зависимости относительных значений лаг-периодов ($t_0/t_0^{(0)}$) и длительности стадии нуклеации ($t^*/t^{*(0)}$) от отношения молярных концентраций α B-Cr и Φ Б. t_0 и $t_0^{(0)}$ – значения лаг-периода в присутствие и в отсутствие α B-Cr соответственно; t^* и $t^{*(0)}$ – значения длительности стадии нуклеации в присутствии и в отсутствие и в присутствии и в отсутствие α B-Cr соответственно; t^* и $t^{*(0)}$ – значения длительности стадии нуклеации в присутствии и в отсутствие α B-Cr соответственно; t^* и $t^{*(0)}$ – значения длительности стадии нуклеации в присутствии и в отсутствие α B-Cr соответственно



Puc. 3. Влияние трегалозы на кинетику агрегации ΦБ (0,3 мг/мл) при 48 °C в отсутствие (*a*) и в присутствии 0,015 мг/мл α B-Cr (*б*). Зависимости интенсивности светорассеяния (*I* – *I*₀) от времени, полученные при следующих концентрациях трегалозы: (*a*) (*I*) 0, (*2*) 33, (*3*) 66, (*4*) 100, (*5*) 133, (*6*) 166, (*7*) 200, (*8*) 250 и (*9*) 350 мМ; (*б*) (*I*) ФБ без добавок, (*2*) 0, (*3*) 33, (*4*) 66, (*5*) 100, (*6*) 200 и (*7*) 350 мМ



Рис. 4. Влияние трегалозы на кинетические параметры агрегации $\Phi \mathbb{B}(0,3 \text{ мг/мл})$ в отсутствие и в присутствии 0,015 мг/мл $\alpha \mathbb{B}$ -Cr при 48 °C. Зависимости относительного ускорения процесса агрегации на стадии нуклеации ($K_{agg}/K_{agg,0}$) (*a*), лаг-периода (t_0) на кинетических кривых агрегации $\Phi \mathbb{B}(\delta)$, величины относительной начальной скорости процесса агрегации на стадии роста агрегатов ($v_0/v_0^{(0)}$) (*в*) и длительности стадии нуклеации (t^*) (*г*) от концентрации трегалозы. Кривые 1 (\bigcirc) и 2 (\Box) на панелях *a*, *б*, *в* и *г* получены в отсутствие и присутствии 0,015 мг/мл $\alpha \mathbb{B}$ -Cr соответственно. На вставке на рис. 4, *б* изображены зависимости относительных значений лаг-периодов ($t_0/t_0^{(0)}$) от концентрации трегалозы (t_0 и $t_0^{(0)}$ – значения лаг-периода в присутствии и в отсутствие трегалозы соответственно)

ствии различных концентраций трегалозы в отсутствие (рис. 3, *a*) и в присутствии 0,015 мг/мл α B-Cr (рис. 3, δ). В обоих случаях наблюдалось подавление агрегации ФБ (рис. 3, *a* и δ).

На основании зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от концентрации трегалозы (рис. 4, *a*) показано, что α B-Cr в концентрации 0,015 мг/мл в 1,3 раза уменьшал значение параметра [L]_{0.5}, рассчитанного по формуле (4), т.е. увеличивал сродство трегалозы к ФБ на стадии нуклеации (табл. 1).

Из рис. 4, δ (вставка) видно, что прирост величины $t_0/t_0^{(0)}$ с ростом концентрации трегалозы становится более заметным в присутствии 0,015 мг/мл α B-Cr.

Анализ зависимости $v_0/v_0^{(0)}$ от концентрации трегалозы (рис. 4, *в*) показал, что α B-Cr в концентрации 0,015 мг/мл практически не оказывал влияния на величину параметра $[L]_{0.5}$, рассчитанного по формуле (5) (табл. 1).

Из рис. 4, *г* видно, что длительность стадии нуклеации (t^*) в отсутствие α B-Cr растет с увеличением концентрации трегалозы от 0 до 150 мМ, а затем при дальнейшем ее увеличении до 350 мМ практически не меняется (кривая *I* на рис. 4, *г*). В присутствии же 0,015 мг/мл α B-Cr (кривая *2* на рис. 4, *г*) величина t^* растет с увеличением концентрации трегалозы.

Таким образом, можно сделать вывод, что влияние трегалозы на процесс агрегации ΦB в присутствии αB -Cr связано в основном с увеличением адсорбционной емкости αB -Cr на стадии нуклеации. Подобное влияние полностью отсутствует на стадии роста агрегатов.

Можно предположить, что развернутые молекулы ФБ образуют комплексы с α B-Cr, которые некоторое время не агрегируют, т.к. в них нет «липких» мест для агрегации. Формирование ядер происходит благодаря образованию дополнительных контактов между развернутыми молекулами ФБ в составе этих комплексов, что требует большего времени и замедляет стадию нуклеации. При этом относительный рост величины лаг-периода выражен тем сильнее, чем выше концентрация α B-Cr. Трегалоза «усиливает» действие α B-Cr. Комплекс белка-мишени с α B-Cr лучше связывает трегалозу (рис. 4, *a*), и на начальных этапах в присутствии трегалозы растет адсорбционная емкость α B-Cr (рис. 2, *a*).

Седиментационный анализ влияния трегалозы на олигомерное состояние αB-Cr и белка-мишени. Ранее было показано, что начальные этапы про-



Рис. 5. Влияние трегалозы на олигомерное состояние α B-Cr (0,2 мг/мл). Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации, c(s), для α B-Cr в отсутствие (сплошная кривая) и в присутствии (пунктирная кривая) 350 мМ трегалозы. Скорость вращения ротора – 48 000 об./мин



Рис. 6. Распределения c(s) по коэффициентам седиментации при 20 °С для ФБ (0,6 мг/мл, сплошная кривая) и смеси ФБ + 350 мМ трегалоза (штриховая кривая)

цесса тепловой агрегации ФБ включают стадию конформационных изменений димеров ФБ и стадию их обратимой диссоциации на мономеры [36, 46], за которыми следуют стадии денатурации мономеров, нуклеации и роста агрегатов [35]. Ввиду того что активность α B-Cr неразрывно связана с его четвертичной структурой, представляло интерес исследовать влияние трегалозы на олигомерное состояние белкового шаперона и белка-мишени, а также на их взаимодействие в течение более длительного времени, а именно после 3-часового инкубирования при 48 °C. Для этой цели использовали метод AUC.

Как видно из рис. 5, трегалоза влияет на распределение c(s) α B-Cr: все распределение сдвинуто в сторону меньших значений коэффициента седиментации ($s_{20,w}$). Это указывает на то, что доля более мелких олигомеров в распределении возрастает в присутствии трегалозы. Кроме того, в присутствии трегалозы значительно возрастает доля диссоциированных форм α B-Cr: на это указывает присутствие пиков с $s_{20,w}$ 5,7 и 8,7 S. Вследствие этого трегалоза может оказывать влияние на шапероноподобную активность α B-Cr.

Влияние 350 мМ трегалозы на олигомерное состояние ФБ. Распределение по коэффициентам седиментации c(s) для ФБ при 20 °С после прогревания белка в течение 3 ч при 48 °С и быстрого охлаждения представляет собой широкий пик в области значений коэффициентов седиментации от 5 до 20 S, включающий разные олигомерные формы частично развернутого белка от мономера до тетрамера и небольших агрегатов. Трегалоза в концентрации 350 мМ стабилизирует преимущественно димерную форму (пик 10 S), а также мономерную и/или частично

Таблица 2. Оценка доли агрегированного белка (γ_{agg}), осаждающегося в процессе ускорения ротора в опыте AUC при 20 °C

Образен	~ (%)
Образец	Yagg (70)
ФБ (0,5 мг/мл)	33
ФБ в присутствии αВ-Cr (0,2 мг/мл)	
*ФБ в присутствии αВ-Сг и 350 мМ трегалозы	
*ФБ в присутствии 350 мМ трегалозы	
	1

Примечание. Образцы до опыта были прогреты при 48 °С в течение 3 ч, затем быстро (в течение 2 мин) охлаждены. * Если трегалозу добавить к образцам после 3-часового прогрева при 48 °С, то она не препятствует выпадению в осадок белка (58% от общего количества) в процессе ускорения ротора, т.е. не действует на агрегацию крупных час-

развернутую димерную (пик 6,8 S) и тетрамерную с пиком 13,5 S (см. рис. 6). Кроме того, в

присутствии осмолита ФБ не оседает в процессе

тиц, образованных ФБ или ФБ и αВ-Сг.

ускорения ротора (табл. 2). При анализе влияния трегалозы на денатурацию ФБ должны быть учтены следующие данные: 1) 350 мМ трегалоза защищает ФБ от образования крупных агрегатов и выпадения их в осадок; 2) если агрегаты уже сформированы, то добавление трегалозы увеличивает долю агрегированного белка (58%) по сравнению с ФБ (33%, табл. 2); 3) трегалоза стабилизирует преимущественно димерную форму белка (с $s_{20 w}$ = 10 S, рис. 6). При интерпретации влияния трегалозы следует учитывать, что процесс агрегации олигомерного белка включает в себя стадию обратимой диссоциации димера ФБ на мономеры, подвергающиеся денатурации (см. обзор [46]). Связываясь в зоне контакта субъединиц, лиганды, как, например, аденозинмонофосфат или глюкозо-6-фосфат, препятствуют диссоциации димера ΦF [36, 46]. На основании вышесказанного и полученных результатов можно предполагать, что трегалоза стабилизирует нативную димерную форму ФБ.

Влияние трегалозы на седиментацию ФБ в присутствии α B-Cr. Из рис. 7, *а* видно, что для смеси ФБ и α B-Cr пики свободного α B-Cr с $s_{20,w}$ 21 и 22,6 S практически исчезают, а пик, соответствующий ФБ (9S), увеличивается и становится более компактным с $s_{20,w} = 9,1$ S. Пики на 6,4 и 14 S могут соответствовать взаимодействию мономера или тетрамера ФБ с мономерной/димерной формой шаперона. В присутствии α B-Cr в изученных условиях значительная часть ФБ оседает при ускорении ротора (около 60%), что почти вдвое больше, чем в отсутствие шаперона. Это указывает на слипание части комплексов ФБ– α B-Cr с образованием более крупных агрегатов.

4 БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

Добавление к смеси ($\Phi F + \alpha B$ -Cr) 350 мМ трегалозы препятствует образованию крупных агрегатов (табл. 2). Доля у_{аgg} сокращается в 5 раз, с 60% до 12% агрегированного белка. Влияние 350 мМ трегалозы на взаимодействие αB-Cr с белком-мишенью продемонстрировано на рис. 7, б. Распределение c(s) в присутствии трегалозы имеет главный узкий пик с $s_{20,w} = 10,4$ S и небольшие пики с 4; 7,5 и 14 S. Сравнение и анализ трех распределений c(s) для смеси α B-Cr и ΦF в отсутствие (рис. 7, *a*, сплошная кривая) и в присутствии 350 мМ трегалозы, а также c(s) для αB-Cr в присутствии 350 мМ трегалозы (рис. 7, б) позволяют сделать вывод о взаимодействии диссоциированных форм белкового



Рис. 7. Взаимодействие $\Phi Б$ (0,6 мг/мл) и αB -Cr (0,2 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 350 мМ трегалозы. *а* – Распределения *c*(*s*) при 20 °С для $\Phi Б$ (пунктирная кривая), αB -Cr (штрих-пунктирная) и их смеси (сплошная). δ – Распределения *c*(*s*) при 20 °С в присутствии 350 мМ трегалозы для αB -Cr (штрих-пунктирная кривая) и смеси $\Phi Б$ и αB -Cr (сплошная кривая)



Рис. 8. Влияние 350 мМ трегалозы на взаимодействие α B-Cr с Φ Б при 48 °C. *a* – Распределения *c*(*s*) для α B-Cr (0,2 мг/мл, штрих-пунктирная кривая), Φ Б (0,6 мг/мл, штриховая) и их смеси (сплошная) были получены при 48 °C и приведены к стандартным условиям при 20 °C. δ – Распределения *c*(*s*) для смеси α B-Cr с Φ Б в отсутствие (штриховая кривая) и в присутствии (сплошная кривая) 350 мМ трегалозы, полученые при 48 °C и приведенные к стандартным условиям при 20 °C. Общее время прогрева образцов (время предварительного инкубирования и время седиментации при 48 °C) составляло 3 ч

шаперона с разными формами белка-мишени в присутствии химического шаперона. Главный пик 10,4 S предполагает возрастание доли нативного димера ΦE , а также взаимодействие димера ΦE с мономером/димером αB -Cr. Образование более крупных высокомолекулярных комплексов также возможно, поскольку 12% белка оседает в виде агрегатов в процессе ускорения ротора (табл. 2).

Поскольку при нагревании образцов в течение 3 ч с последующим быстрым охлаждением (в течение 2 мин) и проведением опытов AUC при 20 °С некоторые стадии общего процесса агрегации ФБ могут быть обратимы, например, начальные стадии диссоциации и денатурации белка. Представляет интерес сравнить эти данные с теми, что были получены непосредственно при 48 °C. Действие трегалозы на смесь (ФБ + α B-Cr) в опыте, проведенном при 48 °C, показано на рис. 8.

Олигомерные состояния αB-Cr и ФБ в опытах при 48 °C отличаются от таковых в опытах при 20 °С (после 3-часового прогрева при 48 °С и быстрого 2-минутного охлаждения во льду с водой). При повышенной температуре ФБ на распределении c(s) представлена преимущественно мономерной формой (пик 5,7 S) и небольшими агрегатами, в то время как крупные агрегаты осаждаются в процессе ускорения ротора. α B-Cr дает два пика на распределении c(s), а именно 19 и 21,5 S, а распределение c(s) для смеси шаперона с белком-мишенью имеет основной пик 4,4 S и небольшой пик 7 S (рис. 8, *a*). Это позволяет предположить, что мономер ФБ взаимодействует с мономером/димером αB-Cr, что приводит к формированию более асимметричного комплекса и уменьшению коэффициента седиментации с 5,7 до 4,4 S. При добавлении 350 мМ трегалозы распределение c(s) для смеси меняется коренным образом (рис. 8, б). Трегалоза, по-видимому, стабилизирует димерную форму ΦF (пик 10 S) и усиливает взаимодействие диссоциированных форм αB-Cr с ФБ (пики 5, 8, 13,4, 16,2 S); при таких условиях возможно также присутствие небольшого количества свободного аВ-Сr (19 S) и более крупных комплексов (27 S).

Различия распределений на рис. 7 и 8 свидетельствуют о том, что начальные стадии процесса тепловой агрегации ΦF , такие как диссоциация и денатурация, а также нуклеация, могут быть частично обратимы.

Трегалоза, по данным ДЛС, оказывает влияние на стадию нуклеации процесса тепловой агрегации ФБ. При этом основной эффект трегалозы в присутствии белкового шаперона связан с увеличением адсорбционной емкости αB-Cr по отношению к белку-мишени на стадии нуклеации (для 66 мМ трегалозы увеличение АС₀ является 1,5-кратным): подобный эффект полностью отсутствует на стадии роста агрегатов. По данным седиментационного анализа, трегалоза, повидимому, стабилизирует димерную форму ФБ и усиливает взаимодействие *а*В-Сг с ФБ. Таким образом, можно сделать следующие выводы: (1) трегалоза влияет на шапероноподобную активность αB-Cr, увеличивая его адсорбционную емкость по отношению к белку-мишени на стадии нуклеации; (2) трегалоза сдвигает равновесие между олигомерными формами αВ-Сг в сторону более мелких олигомерных форм; (3) при тепловом стрессе более активными являются, по-видимому, диссоциированные формы а B-Cr.

Финансирование. Работа Н.А.Ч., Т.Б.Е., В.В.М., С.Г.Р. и Б.И.К. проводилась при поддержке Российского научного фонда (грант

№ 21-14-00178); К.В.Т. – при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Калмыкову П.В. (посмертно) за техническую помощь в проведении SV-опытов.

- 1. Muranov, K. O., and Ostrovsky, M. A. (2022) Molecular mechanisms of the lens transparency maintenance and clouding, Biochemistry (Moscow), 87, in press.
- Dilley, K. J., and Harding, J. J. (1975) Changes in proteins 2. of the human lens in development and aging, Biochem. Biophys. Acta Protein Struct., 386, 391-408, doi: 10.1016/ 0005-2795(75)90283-4.
- Siezen, R. J., Thomson, J. A., Kaplan, E. D., and 3. Benedek, G. B. (1987) Human lens gamma-crystallins: Isolation, identification, and characterization of the expressed gene products, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6088-6092, doi: 10.1073/pnas.84.17.6088.
- 4. Fagerholm, P. P., Philipson, B. T., and Lindström, B. (1981) Normal human lens – the distribution of protein, Exp. Eye Res., 33, 615-620, doi: 10.1016/s0014-4835(81)80101-7
- Sprague-Piercy, M. A., Rocha, M. A., Kwok, A. O., and 5. Martin, R. W. (2021) α -Crystallins in the vertebrate eye lens: complex oligomers and molecular chaperones, Annu. Rev. Phys. Chem., 72, 143-163, doi: 10.1146/annurevphyschem-090419-121428.
- Shamsi, A., Mohammad, T., Anwar, S., Hassan, Md. I., Ahmad, F., et al. (2020) Biophysical insights into implications of PEG-400 on the α -crystallin structure: multispectroscopic and microscopic approach, ACS Omega, 5, 19210-19216, doi: 10.1021/acsomega.0c02648.
- 7. Derham, B. K., and Harding, J. J. (1999) Alpha-crystallin as a molecular chaperone, Prog. Retin. Eye Res., 18, 463-509, doi: 10.1016/s1350-9462(98)00030-5.
- Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a mol-8 ecular chaperone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10449-10453, doi: 10.1073/pnas.89.21.10449.
- 9. Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J., and Weinkauf, S. (2016) Structure and function of α -crystallins: Traversing from in vitro to in vivo, Biochim. Biophys. Acta, 186, 149-166, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.06.008.
- Grosas, A. B., Rekas, A., Mata, J. P., Thorn, D. C., and Carver, J. A. (2020) The Aggregation of α B-crystallin 10. under crowding conditions is prevented by α A-crystallin: implications for α -crystallin stability and lens transparency, J. Mol. Biol., 432, 5593-5613, doi: 10.1016/j.jmb.2020. 08.011
- Riedl M., Strauch, A., Catici, D. A. M., and Haslbeck, M. 11. (2020) Proteinaceous transformers: structural and functional variability of human sHsps, Int. J. Mol. Sci., 21, 5448, doi: 10.3390/ijms21155448.
- 12. Inoue, R., Takata, T., Fujii, N., Ishii, K., Uchiyama, S., et al. (2016) New insight into the dynamical system of αB-crystallin oligomers, Sci. Rep., 6, 29208, doi: 10.1038/ srep29208.
- 13. Hayashi, J., and Carver, J. A. (2020) The multifaceted nature of aB-Crystallin, Cell Stress Chaperones, 25, 639-654, doi: 10.1007/s12192-020-01098-w.
- 14. Liu, Z., Wang, C., Li, Y., Zhao, C., Li, T., et al. (2018) Mechanistic insights into the switch of aB-Crystallin chaperone activity and self-multimerization, J. Biol. Chem., 293, 14880e14890. doi: 10.1074/jbc.RA118. 004034.

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

- Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Sluchanko, N. N., and 15. Kurganov, B. I. (2015) Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions on oligomeric state and chaperone-like activity of αB-Crystallin in crowded media, Int. J. Biol. Macromol.,
- **76**, 86-93, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.022. Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Roman, S. G., Mikhaylova, V. V., Sluchanko, N. N., et al. (2019) 16. Oligomeric state of aB-Crystallin under crowded conditions, Biochem. Biophys. Res. Commun., 508, 1101-1105, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.015.
- 17. Roman, S. G., Chebotareva, N. A., and Kurganov, B. I. (2017) Anti-aggregation activity of small heat shock proteins under crowded conditions, Int. J. Biol. Macromol., 100, 97-103, doi: 10.1016/j.jbiomac.2016.05.080.
- 18. Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., and Uversky, V. N. (2014) What macromolecular crowding can do to a protein? Int. J. Mol. Sci., 15, 23090-23140, doi: 10.3390/ ijms151223090.
- 19. Clark, A. R., Lubsen, N. H., and Slingsby, C. (2012) sHSP in the eye lens: protein mutations, cataract and proteostasis, Int. J. Biochem. Cell Biol., 44, 1687-1697, doi: 10.1016/ j.biocel.2012.02.015.
- Berry, V., Francis, P., Reddy, M. A., Collyer, D., 20 Vithana, E., et al. (2001) Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans, Am. J. Hum. Genet., 69, 1141-1145, doi: 10.1086/324158.
- Graw, J. (2009) Genetics of crystallins: Cataract and 21. beyond, Exp. Eye Res., 88, 173-189, doi: 10.1016/j.exer. 2008.10.011.
- Gerasimovich, E. S., Strelkov, S. V., and Gusev, N. B. 22 (2017) Some properties of three α B-Crystallin mutants carrying point substitutions in the C-terminal domain and associated with congenital diseases, Biochimie, 142, 168-178, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.008.
- Makley, L. N., McMenimen, K. A., DeVree, B. T., Goldman, J. W., McGlasson, B. N., et al. (2015) 23. Pharmacological chaperone for α -crystallin partially restores transparency in cataract models, Science, 350, 674-677, doi: 10.1126/science. aac9145.
- 24 Ghahramani, M., Yousefi, R., Krivandin, A., Muranov, K., Kurganov, B., et al. (2020) Structural and functional characterization of D109H and R69C mutant versions of human αB-Crystallin: the biochemical pathomechanism underlying cataract and myopathy development, Int. J. Biol. Macromol., 146, 1142-1160, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.239.
- 25. Treweek, T. M., Meehan, S., Ecroyd, H., and Carver, J. A. (2015) Small heat-shock proteins: Important players in regulating cellular proteostasis, Cell. Mol. Life Sci., 72, 429-451, doi: 10.1007/s00018-014-1754-5.
- 26. Kulig, M., and Ecroyd, H. (2012) The small heat-shock protein aB-Crystallin uses different mechanisms of chaperone action to prevent the amorphous versus fibrillar aggregation of α -lactalbumin, *Biochem. J.*, **448**, 343-352, doi: 10.1042/BJ20121187.
- 27. Chebotareva, N. A., Roman, S. G., Borzova, V. A., Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., et al. (2020) Chaperonelike activity of HSPB5: The effects of quaternary structure

203

dynamics and crowding, Int. J. Mol. Sci., 21, 4940, doi: 10.3390/ijms21144940.

- 28. Garvey, M., Écroyd, H., Ray, N. J., Gerrard, J. A., and Carver, J. A. (2017) Functional amyloid protection in the eye lens: Retention of α -crystallin molecular chaperone activity after modification into amyloid fibrils, *Biomolecules*, 7, 67, doi: 10.3390/biom7030067.
- Moreau, K. L., and King, J. A. (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention, *Trends Mol. Med.*, 18, 273-282, doi: 10.1016/ j.molmed.2012.03.005.
- Ram, L., Mittal, C., Harsolia, R. S., and Yadav, J. K. (2020) Trehalose inhibits the heat-induced formation of the amyloid-like structure of soluble proteins isolated from human cataract lens, *Protein J.*, **39**, 509-518, doi: 10.1007/ s10930-020-09919-8.
- Jain, N. K., and Roy, I. (2009) Effect of trehalose on protein structure, *Protein Sci.*, 18, 24-36, doi: 10.1002/pro.3.
- Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Sluchanko, N. N., et al. (2019) Comparative effects of trehalose and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin on aggregation of UV-irradiated muscle glycogen phosphorylase *b*, *Biochimie*, **165**, 196-205, doi: 10.1016/ j.biochi.2019.08.006.
- Matsuo, T., Tsuchida, Y., and Morimoto, N. (2002) Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome, *Ophthalmology*, **109**, 2024-2029, doi: 10.1016/s0161-6420(02)01219-8.
- Attanasio, F., Cascio, C., Fisichella, S., Nicoletti, V. G., Pignataro, B., et al. (2007) Trehalose effects on α-crystallin aggregates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 899-905, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.061.
- Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., and Kurganov, B. I. (2016) Kinetic regime of thermal aggregation of holo- and apoglycogen phosphorylases b, Int. J. Biol. Macromol., 92, 1252-1257, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.038.
- Kurganov, B. I., Chebotareva, N. A., Kornilaev, B. A., Malikov, V. P., Orlov, V. N., et al. (2000) Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal mus-

cle glycogen phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **39**, 13144-13152, doi: 10.1021/bi000975w.

- Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J., and Helmreich, E. (1968) Subunit interactions and their relationship to the allosteric properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b, *Biochemistry*, 7, 3590-3607, doi: 10.1021/bi00850a037.
- 38. Mymrikov, E. V., Bukach, O. V., Seit-Nebi, A. S., and Gusev, N. B. (2010) The pivotal role of the beta 7 strand in the intersubunit contacts of different human small heat shock proteins, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 365-377, doi: 10.1007/s12192-009-0151-8.
- Kurganov, B. I. (2013) Antiaggregation activity of chaperones and its quantification, *Biochemistry (Moscow)*, 78, 1554-1566, doi: 10.1134/S0006297913130129.
- 40. Kurganov, B. I. (2017) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones, *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 104-117, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.066.
- 41. Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Roman, S. G., Kleymenov, S. Y., Makeeva, V. F., et al. (2014) Thermal denaturation and aggregation of apoform of glycogen phosphorylase *b*. Effect of crowding agents and chaperones, *Biopolymers*, **101**, 504-516, doi: 10.1002/bip.22410.
- 42. Kurganov, B. I. (1998) Kinetics of heat aggregation of proteins, *Biochemistry (Moscow)*, 63, 364-366.
- Mikhaylova, V. V., Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kalacheva, D. I., and Kurganov, B. I. (2020) Effect of arginine on chaperone-like activity of HspB6 and monomeric 14-3-3ζ, *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 2039, doi: 10.3390/ijms21062039.
- 44. Kurganov, B. I. (1982) Allosteric Enzymes. Kinetic Behaviour, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 56-60.
- 45. Brown, P. H., and Schuck, P. (2006) Macromolecular sizeand-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, *Biophys. J.*, **90**, 4651-4661, doi: 10.1529/biophysj.106.081372.
- Chebotareva, N. A., Roman, S. G., and Kurganov, B. I. (2016) Dissociative mechanism for irreversible thermal denaturation of oligomeric proteins, *Biophys. Rev.*, 8, 397-407, doi: 10.1007/s12551-016-0220-z.

EFFECT OF TREHALOSE ON OLIGOMERIC STATE AND ANTI-AGGREGATION ACTIVITY OF αB-CRYSTALLIN

N. A. Chebotareva*, T. B. Eronina, V. V. Mikhaylova, S. G. Roman, K. V. Tugaeva, and B. I. Kurganov

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: n.a.chebotareva@gmail.com

 α B-Crystallin (α B-Cr), one of the main crystalline lens proteins, along with other crystallins maintains lens transparency suppressing protein aggregation and thus preventing cataractogenesis. α B-Cr belongs to the class of molecular chaperones; being expressed in many tissues it has a dynamic quaternary structure, which is essential for its chaperone-like activity. A shift in the equilibrium between ensembles of oligomers of different size allows regulating the chaperone activity. Trehalose is known to inhibit protein aggregation *in vivo* and *in vitro*, and it is widely used in biotechnology. The results of studying the effect of trehalose on the chaperone-like activity of crystallins can serve as a basis for the design of drugs delaying cataractogenesis. We have studied the trehalose effect on the quaternary structure and anti-aggregation activity of α B-Cr using muscle glycogen phosphorylase *b* (Ph*b*) as a target protein. According to the dynamic light scattering data, trehalose affects the nucleation stage of Ph*b* thermal aggregation at 48 °C, and an increase in α B-Cr adsorption capacity (AC₀) is the main effect of trehalose on the aggregation process in the presence of the protein chaperone (AC₀ increases 1.5-fold in the presence of 66 mM trehalose). According to the stages of denaturation and disso-ciation and enhances the interaction of α B-Cr with the target protein. Moreover, trehalose shifts the equilibrium between α B-Cr oligomers towards the smaller forms. Thus, trehalose affects the quaternary structure of α B-Cr and increases its anti-aggregation activity at the nucleation stage.

Keywords: α B-crystallin, anti-aggregation activity, trehalose, glycogen phosphorylase *b*, dynamic light scattering, analytical ultracentrifugation

УДК 577.21

ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫХ ЗАМЕН ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НА ЦИСТЕИНОВЫЕ НА ТРАНСФОРМАЦИЮ АМИЛОИДОГЕННЫХ БЕЛКОВ

Мини-обзор

© 2022 В.И. Муронец^{1,2*}, Д.В. Поздышев¹, М.В. Медведева², И.А. Севостьянова¹

 ¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vimuronets@belozersky.msu.ru
² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 25.11.2021 После доработки 12.01.2022 Принята к публикации 12.01.2022

В обзоре рассмотрены причины и следствия посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые. Основное внимание уделено заменам Туг-Суѕ, которые возникают при экспрессии генов в бактериальных системах на стадии трансляции белков в результате неправильного узнавания сходных кодонов мРНК. Отмечено, что если в целом ошибки трансляции возникают относительно редко, от 10^{-3} до 10^{-4} ошибок на кодон для *E. coli*, то в некоторых случаях частота ошибок существенно возрастает. Например, это характерно для определенных пар кодонов при изменении условий культивирования или в присутствии антибиотиков. Так, при суперпродукции рекомбинантного альфа-синуклеина человека в клетках *E. coli* содержание мутантой формы с заменой 136-го тирозинового остатка (кодон UAC) на цистеиновый (кодон UGC) может достигать 50%. Рассмотрены возможные причины повышенной продукции альфа-синуклеина с заменами Туг136Суѕ, а также последствия присутствия мутантных форм в препаратах амилоидогенных белков при изучении их патологической трансформации *in vitro*. Отдельный раздел посвящен заменам Туг-Суѕ, ассоциированным с редактированием мРНК аденозиндезаминазами, характерным для эукариотических организмов, и возможной роли этого процесса в амилоидной трансформации белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоидогенные белки, ошибки трансляции, замены Туг-Суѕ, синуклеин, продукция белков в бактериях, амилоидогенез.

DOI: 10.31857/S0320972522020051

введение

На пути передачи информации от молекулы ДНК до синтезируемой полипептидной цепи белка возможно появление ошибок, которые могут существенно изменять свойства белковой молекулы. В обзоре мы остановимся только на механизмах замены остатков тирозина на остатки цистеина, поскольку такая замена кардинально влияет на физико-химические свойства белка. Особое влияние такие замены оказывают на способность белков формировать агрегаты, в том числе и амилоидные. Появление дополнительных остатков цистеина может не только создавать препятствия для правильного формирования пространственной структуры белка, но и приводить к образованию дисульфидных связей между полипептидными цепями, стабилизировать агрегаты и влиять на амилоидную трансформацию белков. Нельзя также исключать возможность появления дополнительных активностей у белков из-за возникновения сульфгидрильных групп, способных участвовать в различных реакциях, прежде всего связанных с окислительно-восстановительными процессами.

Существуют два основных механизма возникновения ошибок при передаче информации от молекулы ДНК до полипептидной цепи — редактирование матричной РНК или «неточное» функционирование рибосомного аппарата. Редактирование мРНК может происходить в результате сплайсинга или под действием аденозиндезаминаз или цитозиндезаминаз. Мы рассмотрим только редактирование мРНК аденозиндезаминазами, поскольку именно воздействие этих ферментов может вызывать точечные

^{*} Адресат для корреспонденции.

замены аминокислотных остатков, которые являются темой данного обзора. Дезаминирование мРНК аденозиндезаминазами приводит к превращению аденозина в инозин, «узнаваемый» в процессе трансляции белка как гуанозин. Остатки тирозина кодируются в ДНК двумя кодонами, ТАТ и ТАС, а в мРНК, соответственно, UAU и UAC. Следовательно, при дезаминировании аденозина мРНК они распознаются как цистеиновые кодоны UGU и UGC, что и приводит к замене остатков тирозина на остатки цистеина в полипептидной цепи.

Редактирование мРНК, приводящее к замене аденозина на инозин – широко распространенное для эукариот явление, однако его функциональная роль до конца не изучена. Дезаминирование аденозина осуществляется группой ферментов из семейства ADAR. Так, у человека семейство представлено тремя белками ADAR1, ADAR2 и ADAR3 [1]. Ферментативная активность для ADAR3 на сегодняшний день не продемонстрирована; предполагают, что он выступает в качестве регулятора процесса редактирования [2]. Для замены аденозина на инозин необходимо взаимодействие ADAR1 или ADAR2 с двуцепочечной РНК. Показано участие белков ADAR в регуляции процессов врожденного иммунитета, циркадных ритмов, развития нервной системы [3]. Существуют свидетельства в пользу того, что нарушения в работе аденозиндезаминаз ассоциированы с развитием аутоиммунных [4] и онкологических заболеваний [5]. Следует также отметить, что редактирование мРНК аденозиндезаминазами в клетках нервных тканей протекает особенно интенсивно. В связи с этим накапливается все больше данных о важности роли аденозиндезаминаз в регуляции функционирования нервных клеток и о взаимосвязи активности этих ферментов и развития нейродегенеративных заболеваний [6].

Сходство кодонов, кодирующих остатки тирозина и цистеина, может приводить к соответствующим заменам в полипептидных цепях и по другой причине. Такие ошибки при считывании информации в процессе трансляции могут быть связаны с неточным узнаванием кодонов некоторыми аминоацил-тРНК. При этом, если редактирование мРНК интенсивно протекает в эукариотических организмах, то ошибки, возникающие в процессе трансляции, характерны для прокариот. Интересно, что для дрожжей, относящихся к эукариотам, были также обнаружены ошибки, возникающие при трансляции, что может указывать на определенные особенности аппарата трансляции у этих организмов.

В обзоре будут суммированы данные о редактировании мРНК аденозиндезаминазами, которые могут приводить к точечным заменам аминокислотных остатков, прежде всего, остатков тирозина на остатки цистеина, а также о возможной взаимосвязи этих процессов с нейродегенеративными заболеваниями. Отдельно будет рассмотрена проблема, связанная с получением рекомбинантных белков, продуцируемых в бактериальных системах, в которых происходит замена остатков тирозина на остатки цистеина. Такая замена у части белковых молекул может существенно изменять физико-химические характеристики белков и приводить к неверной интерпретации полученных результатов.

ОШИБКИ ТРАНСЛЯЦИИ У ПРОКАРИОТ

У прокариотических организмов ошибки при передаче информации от ДНК к белку возникают в процессе трансляции из-за неточного узнавания кодонов мРНК некоторыми аминоацил-тРНК. Известно, что в целом частота таких ошибок при трансляции невелика и составляет для *E. coli* при использовании разных способов оценки от 10^{-3} до 10^{-4} ошибок на кодон [7–9]. Однако вероятность ошибки зависит от многих факторов, прежде всего от условий культивирования и сходства между кодонами. Более подробно особенности неправильного считывания разных кодонов были исследованы на примере люциферазы светлячков, продуцируемой в E. coli [10]. Замена важного для катализа остатка лизина (Lys529) в люциферазе должна приводить к исчезновению ферментативной активности. Тем не менее в препаратах рекомбинантных мутантных форм люциферазы, содержащих разные замены по 529-му остатку, сохранялась ферментативная активность. Было высказано предположение, что сохранение люциферазной активности происходит из-за синтеза некоторого количества белка дикого типа, обусловленного неправильным считыванием кодонов в 529-м положении из-за конкуренции между тРНК^{Lys} и другими тРНК. Было показано, что частота ошибок у E. coli зависит от конкуренции между родственными тРНК за сходные кодоны. Например, замены на остатки лизина остатков аргинина (кодоны AGA и AGG) происходят в 10 раз чаще, чем замены других аминокислотных остатков у мутантных форм белка. Об этом свидетельствует более высокая ферментативная активность мутантных форм, содержащих остаток аргинина в 529-м положении. Важно также отметить, что в присутствии некоторых антибиотиков в несколько раз увеличивается частота ошибок в процессе трансляции, причем величина наблюдаемого эффекта зависит также от типа

тРНК. Аминогликозидные антибиотики существенно увеличивают частоту ошибок для сходных кодонов, но практически не изменяют число ошибок по кодонам в целом. Так, для кодона AAU, кодирующего аспарагин, частота ошибок в присутствии паромомицина увеличивается почти в 10 раз и достигает $1,3 \times 10^{-2}$ [10]. Снижение точности трансляции в присутствии аминогликозидных антибиотиков, а также при добавлении ионов магния было подтверждено и в других работах [11, 12].

С развитием методов масс-спектрометрии накапливается все больше данных о заменах аминокислотных остатков в рекомбинантных эукариотических белках, продуцируемых в бактериальных системах [13-15]. Как правило, такие замены характерны для редких в бактериальных системах кодонов [14-17]. Например, при использовании редкого кодона GGA в продуцируемых в E. coli белках происходила замена остатков глутаминовой кислоты на остатки глицина [16]. Наблюдались также замены лизиновых остатков (AAA) на аргининовые (AGA) [17] и аргининовых на лизиновые [15], а также аргининовых (CGG) на глутаминовые (CAG) [14]. В полученных препаратах содержание белков с возникшими в процессе трансляции заменами может достигать 10-40% [14, 15, 17].

ОШИБКИ ТРАНСЛЯЦИИ В ДРОЖЖАХ

Принято считать, как уже отмечалось выше, что неправильное считывание информации на пути от ДНК к белкам для прокариот обусловлено ошибками в процессе трансляции, а для эукариот – редактированием мРНК дезаминазами. Однако достаточно высокий уровень ошибок при трансляции был обнаружен и у некоторых эукариот, а именно у пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae [18, 19]. Так, с использованием описанной выше системы детекции с люциферазой было показано, что частота ошибок варьирует от 4×10^{-5} до 6.9×10^{-4} на кодон, т.е. в среднем в 3 раза ниже, чем для бактериальной системы [19]. При этом для дрожжей характерно более избирательное действие аминогликозидных антибиотиков. Так, для одних кодонов добавление паромомицина не влияет на частоту ошибок, а для других – увеличивает количество ошибок в несколько раз. Авторы предполагают, что в пекарских дрожжах существуют дополнительные механизмы, предотвращающие неточную трансляцию, в отличие от *E. coli*. Возможно, именно более точная работа эукариотических рибосом может снижать вероятность возникновения ошибок в процессе трансляции.

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

Однако нельзя исключить, что ошибки в процессе трансляции из-за конкуренции между тРНК все-таки происходят и у других эукариотических организмов, хотя и с меньшей частотой. К сожалению, пока не получено экспериментальных данных, подтверждающих или опровергающих такое предположение.

ОШИБКИ ТРАНСЛЯЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ЗАМЕНЕ ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НА ЦИСТЕИНОВЫЕ

Тирозиновые остатки кодируются в матричной РНК двумя кодонами – UAU и UAC, а цистеиновые остатки сходными кодонами – UGU и UGC. Как было отмечено во введении, редактирование мРНК аденозиндезаминазами может приводить к заменам тирозиновых остатков на цистеиновые у эукариот. Однако для прокариот из-за отсутствия аденозиндезаминаз характерен другой механизм – появление ошибок в процессе трансляции из-за неправильного узнавания кодонов. Механизм такой замены схематически представлен на рис. 1. В верхней части рисунка продемонстрирована конкуренция за связывание между разными аминоацил-тРНК с UAC-кодоном мРНК в А-сайте рибосомы. Вследствие неточной работы трансляционного аппарата происходит неверное считывание кодона и появление в полипептидной цепи цистеинового остатка вместо тирозинового. Цистеиновые остатки могут образовывать дисульфидные связи, соединяющие полипептидные цепи.

Первые указания на возможность замены тирозиновых остатков на цистеиновые были получены в середине 80-х годов. Было показано, что при синтезе in vivo белка Ocr бактериофага Т7 происходит включение остатков цистеина в положение, обычно занимаемое тирозиновым остатком [20]. В дальнейшем избирательно замены именно тирозиновых остатков на цистеиновые не исследовали, хотя исходя из характерной для E. coli частоты ошибок, можно было ожидать, что она должна быть не слишком высокой и составлять от 10⁻³ до 10⁻⁴ ошибок на кодон. Однако при экспрессии человеческого альфа-синуклеина в клетках E. coli было обнаружено, что у значительной части синтезированного белка Tyr136 (кодон UAC) заменен на остаток цистеина [21, 22]. При этом замен других остатков тирозина, кодируемых триплетом UAU, обнаружено не было. Замена одного из нуклеотидов в кодирующем 136-й тирозиновый остаток кодоне (UAU) полностью предотвращала возникновение мутантного белка с такими заменами [21]. Оказалось также, что эффектив-



Рис. 1. Ошибки считывания кодонов в процессе трансляции белков у прокариот. Конкуренция за связывание между разными аминоацил-тРНК с UAC-кодоном мРНК в А-сайте рибосомы. Неточная работы трансляционного аппарата приводит к неверному считыванию кодона и к появлению в полипептидной цепи цистеинового аминокислотного остатка вместо тирозинового. Сшивка полипептидных цепей дисульфидными связями через цистеиновые остатки

ность замены 136-го тирозинового остатка на остаток цистеина зависит от pH клеточной среды для культивирования клеток: при закислении среды до pH 6,6 содержание мутантного альфа-синуклеина, содержащего в 136-м положении остаток цистеина, достигало 50% [22]. Идентифицировать появление мутантных форм

было довольно просто, т.к. содержащие цистеиновый остаток молекулы альфа-синуклеина образовывали соединенные дисульфидной связью димеры. Такие димеры можно было обнаружить при проведении электрофореза в денатурирующих условиях без добавления бета-меркаптоэтанола. Вероятно, частота ошибок в процессе

трансляции альфа-синуклеина возрастала из-за использования аминогликозидного антибиотика канамицина при культивировании клеток, как это было показано ранее для других рекомбинантных белков. Кроме того, содержание мутантного белка может увеличиваться из-за недостатка тирозина в условиях суперпродукции рекомбинантного белка.

ВОЗМОЖНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ОШИБОК, ПРИВОДЯЩИХ К ЗАМЕНЕ ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НА ЦИСТЕИНОВЫЕ

При получении рекомбинантных белков в бактериальных системах обычно не обращают внимания на возможные замены аминокислотных остатков из-за ошибок, возникающих в процессе трансляции. Прежде всего, это связано с невысокой частотой возникновения таких ошибок. Кроме того, часто замены аминокислотных остатков приводят к неправильному сворачиванию белковой глобулы и такие белки, формирующие ненативные структуры, подвергаются протеолитическому расщеплению. Однако, как показывают приведенные в предыдущем разделе примеры [21, 22], в некоторых случаях образуются значительные количества мутантных белков, содержащих замены аминокислотных остатков. Возможно, накопление мутантного альфа-синуклеина в описанных примерах облегчается тем, что он относится к так называемым «естественно развернутым белкам», и его деградация не регулируется характерными для глобулярных белков механизмами.

При исследовании рекомбинантного мутантного альфа-синуклеина, содержащего цистеиновый остаток в 136-м положении, было показано, что для такого белка не характерна амилоидная трансформация. Более того, мутантный альфа-синуклеин препятствовал формированию амилоидных фибрилл нативными формами альфа-синуклеина [22]. Вполне возможно, что некоторые результаты, полученные на препаратах рекомбинантного альфа-синуклеина, содержащего примеси мутантной формы с заменами Tyr136Cys, некорректны из-за воздействия мутантной формы на трансформацию альфа-синуклеина дикого типа. К сожалению, принятые процедуры оценки гомогенности препаратов рекомбинантных белков, включающие только проведение электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии бета-меркаптоэтанола, не позволяют выявить примесь соединенных дисульфидными связями полипептидных цепей. Более того, при масс-спектрометрии не всегда легко обнаружить такие замены, исследуя

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

смесь исходного и мутантного белка, из-за модификаций цистеиновых остатков, особенностей экстракции цистеин-содержащих полипептидов из гелей и ряда других причин. Следовательно, следует внимательно отслеживать возможные ошибки трансляции при получении рекомбинантных белков в бактериальных системах. С особой осторожностью надо относиться к результатам, полученным с рекомбинантными естественно развернутыми белками, поскольку в них может происходить значительное накопление мутантных форм, как это было показано для альфа-синуклеина. Как минимум, следует выявлять возможные замены тирозиновых остатков на цистеиновые. Обнаружить их достаточно просто по появлению олигомерных форм белка при проведении электрофореза в отсутствие восстанавливающих дисульфидные связи соединений. Очевидно, что именно возникновение «поперечных сшивок», нехарактерных для белков дикого типа, может существенно влиять на процессы амилоидной трансформации, к которой склонны многие естественно развернутые белки, участвующие в возникновении и развитии нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы. Таким образом, при моделировании in vitro амилоидной трансформации белков следует обязательно учитывать возможность присутствия в препаратах мутантных форм, содержащих замены аминокислотных остатков из-за ошибок, появляющихся на стадии трансляции.

РЕДАКТИРОВАНИЕ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ У ЭУКАРИОТ

Редактирование матричной РНК аденозиндезаминами было обнаружено у различных эукариотических организмов более 20 лет назад [23–25]. Этот фермент, а точнее несколько ферментов, отличающихся по субстратной специфичности, дезаминируют остатки аденозина с образованием инозина. В процессе трансляции инозиновый остаток опознается как гуанозиновый, что приводит к изменению информационного значения триплета. Редактированию матричной РНК аденозиндезаминазами посвящено много экспериментальных статей, в том числе обзорных [26, 27], включая подробный анализ проблемы в статье Ключниковой и соавт. [28]. По этой причине мы не будем останавливаться на редактировании матричной РНК аденозиндезаминазами в целом, а рассмотрим только те аспекты, которые связаны с редактированием, вызывающим замены тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных

белках, связанных с нейродегенеративными заболеваниями. Схема замены тирозиновых остатков на цистеиновые в результате редактирования мРНК аденозиндезаминазами представлена на рис. 2. Тирозиновые остатки в мРНК кодируются двумя триплетами (UAU и UAC) и, следовательно, при дезаминировании аденозина в любом из них возможна замена остатков тирозина на остатки цистеина, кодируемого триплетами UGU и UGC. На первом этапе в результате редактирования ADAR происходит замена аденозинового остатка на инозиновый. Затем инозиновый остаток считывается тРНК^{Суѕ} как гуанозиновый, что приводит к появлению в полипептидной цепи цистеинового аминокислотного остатка вместо тирозинового. Такая замена может приводить к образованию новых дисульфидных связей в продукте трансляции, причем как внутриполипептидных (рис. 2, e), так и межполипептидных.

Как показывают эксперименты на рекомбинантных белках, описанные в предыдущих разделах, замены тирозиновых остатков на цистеиновые в процессе трансляции могут кардинально изменять амилоидную трансформацию естественно развернутых белков. Следовательно, такое изменение их трансформации может происходить в результате редактирования мРНК аденозиндезаминазами из-за появления мутантных форм белков с дополнительным остатком цистеина.

Анализ литературных данных указывает, что аденозиндезаминазы ADAR1, ADAR2 и ADAR3 вовлечены в патогенез неврологических и нейродегенеративных заболеваний [29]. В частности, изменения в профилях редактирования мРНК показаны при болезнях, для которых характерно образование телец включения, таких как болезнь Альцгеймера и Гентингтона [30, 31]. Для большинства случаев неврологических заболеваний показано общее снижение числа замен аденозина на инозин. Для образцов мозга пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера или Гентингтона зарегистрировано уменьшение редактирования в позиции, приводящее к замене 607 остатка глутамина на аргинин в субъединице GluA2 ионотропного рецептора глутамата, что, как полагают, приводит к гибели мотонейронов [32]. Число генов, для мРНК которых показано значимое снижение числа замен аденозина на инозин в процессе развития упомянутых нейродегенеративных заболеваний, растет [33], причем описаны позиции, приводящие к замене тирозина на цистеин, как, например, Tyr571Cys в субъединице GluR6 ионотропного рецептора глутамата [34]. Однако пока отсутствуют прямые экспериментальные данные о влиянии замен тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках на нейродегенеративные процессы.

Развитие методов секвенирования нового поколения резко ускорило выявление сайтов замены аденозина на инозин: так, в существующих базах данных зарегистрированы миллионы таких потенциальных сайтов редактирования, предсказанных на основе данных RNA-seq. Одна из таких баз данных, REDIportal [35], собрана из позиций, для которых секвенированием была выявлена замена А на G, при условии, что ранее в геномных данных не была показана такая однонуклеотидная вариация. На наш взгляд, пристальное внимание следует обратить на сайты редактирования в генах, кодирующих естественно развернутые белки. Во-первых, именно такие белки склонны к амилоидной трансформации и связаны с нейродегенеративными процессами, а, во-вторых, они в меньшей степени будут подвержены деградации в клетке, чем глобулярные белки, не способные свернуться в правильную конформацию из-за замены тирозиновых остатков на цистеиновые. С учетом специфичного взаимодействия редактирующих ферментов ADAR1 и ADAR2 с двуцепочечной РНК, с помощью алгоритма поиска потенциальных шпилек в структуре мРНК генов человека было выявлено более тысячи тирозиновых кодонов UAC, которые могут представлять потенциальную мишень для аденозиндезаминаз. Среди генов, содержащих такие кодоны, оказалось 19 тех, что кодируют белки с неструктурированными участками, зарегистрированными в базе данных DisProt [36]. При этом два из найденных генов ассоциированы с нейрогенезом: белок Protein numb homolog (h-Numb, идентификатор UniProt P49757) и белок Paired box protein Pax-6 (идентификатор UniProt Р26367). Важно отметить, что в состав белка h-Numb исходно входит четное число цистеиновых остатков, что позволяет предполагать, что редактирование мРНК в данном случае может приводить к появлению нечетного числа цистеиновых остатков и формированию димеров за счет образования межполипептидных дисульфидных связей. Возникновение таких «поперечных сшивок» может быть вовлечено в формирование прочных белковых агрегатов, характерных для амилоидных заболеваний. Если же сузить поиск и обратиться к базе данных RADAR [37], содержащей установленные ранее сайты редактирования РНК, то количество потенциальных кандидатов станет еще меньше. Среди белков, для которых было установлено редактирование UAC-кодона, лишь один можно отнести к естественно развернутым белкам, связан-



Рис. 2. Дезаминирование остатков аденозина мРНК аденозиндезаминазами (ADAR) у эукариот. a – Замена аденозинового остатка на инозиновый в результате редактирования ADAR. δ – Считывание инозинового остатка тРНК^{Суs} как гуанозинового и появление в полипептидной цепи цистеинового аминокислотного остатка вместо тирозинового. e – Образование дисульфидных связей в продукте трансляции

ным с нейродегенерацией — белок септин 4 (идентификатор UniProt O43236). Однако экспериментальные данные о том, что септин 4 действительно может синтезироваться в мутантной форме, есть только на уровне транскриптома [38]. Можно было предположить, что обнаруженные при продукции альфа-синуклеина в *E. coli* замены Туг-Суѕ могут возникнуть и в эукариотических организмах в результате редактирования мРНК. Тем не менее наши попытки найти замены Туг136Суѕ в альфа-синуклеине при его продукции в эукариотических клетках (нейробластомы) оказались безрезультатными [39].

Для изучения последствий редактирования РНК на белковом уровне оптимальным подходом является масс-спектрометрическая протеомика, преимущества которой подробно описаны в специальном обзоре [28]. Однако именно при изучении замен Tyr-Cys в белках могут возникнуть определенные сложности, а именно, при проведении таких исследований следует учитывать все возможные посттрансляционные модификации цистеиновых остатков (окисление различной степени, образование дисульфидных связей, нитрозилирование, алкилирование). Предотвратить возникновение разнообразных продуктов модификации можно с помощью предварительной обработки белков йодацетатом для получения карбоксиметилированнных форм. Таким образом, при проведении масс-спектрометрических исследований необходимо прицельно искать предполагаемые замены Tyr-Cys, а не проводить стандартный анализ. Вероятно, оптимальным был бы подход с предварительным биоинформатическим анализом для выявления потенциальных белков-кандидатов. Такой анализ позволил бы оценить, в каких белках, связанных с процессами нейродегенерации, могут происходить замены Tyr-Cys вследствие редактирования мРНК аденозиндезаминазами. Это позволило бы затем отобрать наиболее перспективные кандидаты для последующей экспериментальной проверки как с помощью масс-спектрометрического анализа, так и других подходов, включая работу с клеточными культурами и анализ особенностей патологической трансформации амилоидогенных белков с выявленными заменами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре мы обсудили в основном механизмы посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках, поскольку именно такие замены могут приводить к существенным изменениям в процессе их патологической трансформации. Такие изменения возникают из-за необычных свойств цистеиновых остатков, а именно их способности подвергаться окислению и другим модификациям (нитрозилирование, алкилирование и др.), а также образовывать дисульфидные связи. При этом формирование дисульфидных связей может как стабилизировать амилоидные агрегаты за счет «поперечной сшивки» полипептидных цепей, так и препятствовать их амилоидной трансформации из-за образования димерных и олигомерных форм, не склонных к такому типу агрегации.

Единичные наблюдения о замене тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках при их продукции в бактериальных системах требуют, на наш взгляд, особого внимания. Так как в препаратах рекомбинантных белков содержание мутантных форм с дополнительными цистеиновыми остатками может достигать 50%, то процесс их амилоидной трансформации может существенно изменяться. Следовательно, требуется проведение дополнительного анализа, позволяющего выявить мутантные белки, содержащие остатки цистеина, и, при необходимости, очистить от них рекомбинантные белки дикого типа. Только после проведения таких процедур можно избавиться от возможных артефактов, возникающих при изучении патологической трансформации амилоидогенных белков из-за присутствия в них мутантных форм.

Изучение роли посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках, происходящих в результате дезаминирования мРНК специальными ферментами, находится на начальной стадии. Хотя о роли редактирования мРНК, особенно в функционировании нервных тканей, в целом известно достаточно много, информация о влиянии такого типа замен (Tyr-Cys) в амилоидогенных белках на нейродегенеративные процессы отсутствует. При этом известно, что появление в составе амилоидных белков дополнительных цистеиновых остатков существенно изменяет их способность к патологической трансформации [40, 41]. В целом, дисульфидные связи стабилизируют амилоидные фибриллы, а в случае прионных белков их образование является одним из механизмов трансформации белка в инфекционную форму [42-46]. В бета-амилоидном пептиде, альфа-синуклеине, тау-белке и хантингтине дикого типа нет цистеиновых остатков. Однако введение в эти белки шистеиновых остатков, вызывающих образование межполипептидных и/или внутриполипептидных связей, приводит к кардинальному изменению процесса их амилоидной трансформации. Эффекты, возникающие при введении остатков цистеина, зависят как от количества замен, так и от их локализации. Некоторые замены ускоряют амилоидоизацию, например, за счет образования димерных форм альфа-синуклеина [47, 48] или дрожжевого приона Sup35 [49]. Другие препятствуют формированию амилоидных структур: например, альфа-синуклеин с заменой Туг136Суз [22], альфа-синуклеин с тремя дисульфидными связями [50]. Таким образом, хотя точно предсказать эффекты от замены Туг-Суѕ сложно, но изучение роли редактирования мРНК, приводящее к таким заменам в амилоидогенных белках,

- 1. Nishikura, K. (2010) Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases, Annu. Rev. Biochem., 79, 321-349, doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-105251.
- Chen, C. X., Cho, D. S., Wang, Q., Lai, F., Carter, K. C., et al. (2000) A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both singleand double-stranded RNA binding domains, RNA, 6, 755-767, doi: 10.1017/s1355838200000170.
- 3. Sinigaglia, K., Wiatrek, D., Khan, A., Michalik, D., Sambrani, N., et al. (2019) ADAR RNA editing in innate immune response phasing, in circadian clocks and in sleep, Biochim. Biophys. Acta, 1862, 356-369, doi: 10.1016/j.bbagrm. 2018.10.011.
- Roth, S. H., Danan-Gotthold, M., Ben-Izhak, M., 4 Rechavi, G., Cohen, C. J., et al. (2018) Increased RNA editing may provide a source for autoantigens in systemic lupus erythematosus, Cell Rep., 23, 50-57, doi: 10.1016/ j.celrep.2018.03.036.
- 5. Silvestris, D. A., Picardi, E., Cesarini, V., Fosso, B., Mangraviti, N., et al. (2019) Dynamic inosinome profiles reveal novel patient stratification and gender-specific differences in glioblastoma, Genome Biol., 20, 33, doi: 10.1186/s13059-019-1647-x.
- Costa Cruz, P. H., and Kawahara, Y. (2021) RNA Editing 6. in Neurological and Neurodegenerative Disorders, in RNA Editing (Picardi, E., and Pesole, G., eds.) Springer US, New York, NY, pp. 309-330, doi: 10.1007/978-1-0716-0787-9_18.
- 7. Parker, J. (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code, Microbiol. Rev., 53, 273-298, doi: 10.1128/mr.53.3.273-298.
- 8. Loftfield, R. B., and Vanderjagt, D. (1972) The frequency of errors in protein biosynthesis, Biochem. J., 128, 1353-1356, doi: 10.1042/bj1281353.
- 9. Khazaie, K., Buchanan, J. H., and Rosenberger, R. F. (1984) The accuracy of Qbeta RNA translation. 1. Errors during the synthesis of Qbeta proteins by intact Escherichia coli cells, Eur. J. Biochem., 144, 485-489, doi: 10.1111/ j.1432-1033.1984.tb08491.x.
- 10. Kramer, E. B., and Farabaugh, P. J. (2007) The frequency of translational misreading errors in E. coli is largely determined by tRNA competition, RNA, 13, 87-96, doi: 10.1261/ rna.294907.

представляется важным для понимания механизмов возникновения и развития нейродегенеративных заболеваний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00421).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 11. Wohlgemuth, I., Garofalo, R., Samatova, E., Günenç, A. N., Lenz, C., et al. (2021) Translation error clusters induced by aminoglycoside antibiotics, Nat. Commun., 12, 1830, doi: 10.1038/s41467-021-21942-6.
- Zhang, J., Pavlov, M. Y., and Ehrenberg, M. (2018) 12. Accuracy of genetic code translation and its orthogonal corruption by aminoglycosides and Mg2+ ions, Nucleic Acids Res., 46, 1362-1374, doi: 10.1093/nar/gkx1256.
- 13. Garofalo, R., Wohlgemuth, I., Pearson, M., Lenz, C., Urlaub, H., et al. (2019) Broad range of missense error frequencies in cellular proteins, Nucleic Acids Res., 47, 2932-2945, doi: 10.1093/nar/gky1319.
- McNulty, D. E., Claffee, B. A., Huddleston, M. J., Porter, 14. M. L., Cavnar, K. M., et al. (2003) Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in Escherichia coli, Protein Express. Purif., 27, 365-374, doi: 10.1016/s1046-5928(02)00610-1.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D., and Oas, T. G. (1996) 15. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in Escherichia coli, J. Mol. Biol., 262, 407-412, doi: 10.1006/jmbi.1996.0524.
- 16. Huang, Y., O'Mara, B., Conover, M., Ludwig, R., Fu, J., et al. (2012) Glycine to glutamic acid misincorporation observed in a recombinant protein expressed by Escherichia coli cells, Protein Sci., 21, 625-632, doi: 10.1002/pro.2046.
- 17. Liu, Y., Sharp, J. S., Do, D. H.-T., Kahn, R. A., Schwalbe, H., et al. (2017) Mistakes in translation: Reflections on mechanism, PLoS One, 12, e0180566, doi: 10.1371/journal.pone.0180566.
- Zimmerman, S. M., Kon, Y., Hauke, A. C., Ruiz, B. Y., 18. Fields, S., et al. (2018) Conditional accumulation of toxic tRNAs to cause amino acid misincorporation. Nucleic Acids Res., 46, 7831-7843, doi: 10.1093/nar/gky623.
- 19. Kramer, E. B., Vallabhaneni, H., Mayer, L. M., and Farabaugh, P. J. (2010) A comprehensive analysis of translational missense errors in the yeast Saccharomyces cerevisiae, RNA, 16, 1797-1808, doi: 10.1261/rna.2201210.
- 20. Rice, J. B., Seyer, J. J., and Reeve, J. N. (1986) Identification of sites of cysteine misincorporation during in vivo synthesis of bacteriophage T7 0.3 protein, Biochim. Biophys. Acta, 867, 57-66, doi: 10.1016/0167-4781(86)90029-1.
- 21. Masuda, M., Dohmae, N., Nonaka, T., Oikawa, T., Hisanaga, S., et al. (2006) Cysteine misincorporation in

bacterially expressed human α -synuclein, *FEBS Lett.*, **580**, 1775-1779, doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.032.

- Barinova, K. V., Kuravsky, M. L., Arutyunyan, A. M., Serebryakova, M. V., Schmalhausen, E. V., et al. (2017) Dimerization of Tyr136Cys alpha-synuclein prevents amyloid transformation of wild type alpha-synuclein, *Int. J. Biological Macromol.*, 96, 35-43, doi: 10.1016/ j.ijbiomac.2016.12.011.
- Kim, U., Wang, Y., Sanford, T., Zeng, Y., and Nishikura, K. (1994) Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 91, 11457-11461, doi: 10.1073/pnas.91.24.11457.
- Kim, U., and Nishikura, K. (1993) Double-stranded RNA adenosine deaminase as a potential mammalian RNA editing factor, *Semin. Cell Biol.*, 4, 285-293, doi: 10.1006/ scel.1993.1034.
- Maas, S., Melcher, T., and Seeburg, P. H. (1997) Mammalian RNA-dependent deaminases and edited mRNAs, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 343-349, doi: 10.1016/ S0955-0674(97)80006-3.
- Yuting, K., Ding, D., and Iizasa, H. (2021) Adenosine-to-Inosine RNA Editing Enzyme ADAR and microRNAs, *Methods Mol. Biol.*, 2181, 83-95, doi: 10.1007/978-1-0716-0787-9_6.
- Mallela, A., and Nishikura, K. (2012) A-to-I editing of protein coding and noncoding RNAs, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 47, 493-501, doi: 10.3109/10409238.2012. 714350.
- Kliuchnikova, A. A., Kuznetsova, K. G., and Moshkovskii, S. A. (2016) ADAR-mediated messenger RNA editing: Analysis at the proteome level, *Biochemistry (Moscow)*, *Suppl. Series B Biomed. Chem.*, **11**, 32-42, doi: 10.18097/ PBMC20166205510.
- Maas, S., Kawahara, Y., Tamburro, K. M., and Nishikura, K. (2006) A-to-I RNA editing and human disease, *RNA Biol.*, 3, 1-9, doi: 10.4161/rna.3.1.2495.
- Gaisler-Salomon, I., Kravitz, E., Feiler, Y., Safran, M., Biegon, A., et al. (2014) Hippocampus-specific deficiency in RNA editing of GluA2 in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, 35, 1785-1791, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.018.
- Akbarian, S., Smith, M. A., and Jones, E. G. (1995) Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia, *Brain Res.*, 699, 297-304, doi: 10.1016/0006-8993(95)00922-D.
- Hosaka, T., Tsuji, H., and Kwak, S. (2021) RNA editing: A new therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis and other neurological diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 10958, doi: 10.3390/ijms222010958.
- Khermesh, K., D'Erchia, A. M., Barak, M., Annese, A., Wachtel, C., et al. (2016) Reduced levels of protein recoding by A-to-I RNA editing in Alzheimer's disease, *RNA*, 22, 290-302, doi: 10.1261/rna.054627.115.
- Lo Giudice, C., Tangaro, M. A., Pesole, G., and Picardi, E. (2020) Investigating RNA editing in deep transcriptome datasets with REDItools and REDIportal, *Nat. Protocols*, 15, 1098-1131, doi: 10.1038/s41596-019-0279-7.
- Mansi, L., Tangaro, M. A., Lo Giudice, C., Flati, T., Kopel, E., et al. (2021) REDIportal: Millions of novel Ato-I RNA editing events from thousands of RNAseq exper-

iments, Nucleic Acids Res., 49, D1012-9, doi: 10.1093/nar/gkaa916.

- Hatos, A., Hajdu-Soltész, B., Monzon, A. M., Palopoli, N., Álvarez, L., et al. (2019) DisProt: Intrinsic protein disorder annotation in 2020, *Nucleic Acids Res.*, gkz975, doi: 10.1093/nar/gkz975.
- Ramaswami, G., and Li, J. B. (2014) RADAR: A rigorously annotated database of A-to-I RNA editing, *Nucleic Acids Res.*, 42, D109-13, doi: 10.1093/nar/gkt996.
- Picardi, E., D'Erchia, A. M., Lo Giudice, C., and Pesole, G. (2017) REDIportal: A comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans, *Nucleic Acids Res.*, 45, D750-7, doi: 10.1093/nar/gkw767.
- 39. Pozdyshev, D. V., Melnikova, A. K., Barinova, K. V., Schmalhausen, E. V., and Muronetz, V. I. (2020) Differences in the synthesis of recombinant α -synuclein in pro-and eukaryotic organisms: Possibility of Tyr136Cys substitution, *Curr. Top. Peptide Prot. Res.*, **21**, 75-81.
- 40. Feughelman, M., andWillis, B. K. (2000) Thiol-disulfide interchange a potential key to conformational change associated with amyloid fibril formation, *J. Theor. Biol.*, **206**, 313-315, doi: 10.1006/jtbi.2000.2112.
- Li, Y., Yan, J., Zhang, X., and Huang, K. (2013) Disulfide bonds in amyloidogenesis diseases related proteins, *Proteins*, 81, 1862-1873, doi: 10.1002/prot.24338.
- 42. Maiti, N. R., and Surewicz, W. K. (2001) The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein, *J. Biol. Chem.*, **276**, 2427-2431, doi: 10.1074/jbc.M007862200.
- 43. Lee, S., and Eisenberg, D. (2003) Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 725-730, doi: 10.1038/nsb961.
- Hosszu, L. L. P., Trevitt, C. R., Jones, S., Batchelor, M., Scott, D. J., et al. (2009) Conformational properties of beta-PrP, *J. Biol. Chem.*, 284, 21981-21990, doi: 10.1074/ jbc.M809173200.
- 45. Welker, E., Wedemeyer, W. J., and Scheraga, H. A. (2001) A role for intermolecular disulfide bonds in prion diseases? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4334-4336, doi: 10.1073/pnas.071066598.
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stöckel, J., Moffat, B., Reilly, D., et al. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein, *Biochemistry*, **35**, 5528-5537, doi: 10.1021/ bi952965e.
- 47. Suk, J.-E., Lokappa, S. B., and Ulmer, T. S. (2010) The clustering and spatial arrangement of beta-sheet sequence, but not order, govern alpha-synuclein fibrillogenesis, *Biochemistry*, **49**, 1533-1540, doi: 10.1021/bi901753h.
- 48. Zhou W., and Freed, C. R. (2004) Tyrosine-to-cysteine modification of human alpha-synuclein enhances protein aggregation and cellular toxicity, *J. Biol. Chem.*, **279**, 10128-10135, doi: 10.1074/jbc.M307563200.
- Krishnan, R., and Lindquist, S. L. (2005) Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity, *Nature*, 435, 765-772, doi: 10.1038/ nature03679.
- Hong, D.-P., Xiong, W., Chang, J.-Y., and Jiang, C. (2011) The role of the C-terminus of human α-synuclein: Intradisulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers, *FEBS Lett.*, 585, 561-566, doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.009.

POST-TRANSCRIPTIONAL TYROSINE SUBSTITUTIONS FOR CYSTEINE IN AMYLOIDOGENIC PROTEINS

Mini-Review

V. I. Muronetz^{1,2*}, D. V. Pozdyshev¹, M. V. Medvedeva², and I. A. Sevostyanova¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

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

The review considers the reasons and consequences of post-transcriptional tyrosine substitutions for cysteine residues. The main attention is paid to Tyr-Cys substitutions that arise during gene expression in bacterial systems at the stage of protein translation as a result of similar mRNA codons misrecognition. Notably, if translation errors generally occur relatively rarely – from 10^{-3} to 10^{-4} errors per codon for *E. coli*, then in some cases the error rate increases significantly. For example, for certain pairs of codons, when the culture conditions change or in the presence of antibiotics. Thus, with the overproduction of recombinant human alpha-synuclein in *E. coli* cells, the content of the mutant form with the replacement of 136 tyrosine residue (UAC codon) with a cysteine residue (UGC codon) can reach 50%. Possible reasons for the increased production of alpha-synuclein with Tyr136Cys substitutions are considered, as well as the consequences of the presence of mutant forms in preparations of amyloidogenic proteins when studying their pathological transformation *in vitro*. A separate section is devoted to Tyr-Cys substitutions occurring due to adenosine deaminases mRNA editing, typical for eukaryotic organisms, and the possible role of this process in the amyloid transformation of proteins associated with neurodegenerative diseases.

Keywords: amyloidogenic proteins, translation errors, Tyr-Cys substitutions

УДК 577.352

МЕХАНИЗМ ЗАПАСАНИЯ И ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В МИТОХОНДРИЯХ НА МЕЖФАЗНОЙ ГРАНИЦЕ ВОДА-МЕМБРАНА

Обзор

© 2022 С.В. Нестеров^{1,2}, Е.Г. Смирнова³, Л.С. Ягужинский^{2,3,4*}

¹ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

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

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет

им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: yag@genebee.msu.ru

⁴ НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.12.2021 После доработки 11.01.2022 Принята к публикации 13.01.2022

В данном аналитическом обзоре на модельных и природных системах рассмотрены разные способы генерации мембраносвязанных протонов, использующие различные внешние источники энергии. Анализ показал, что все три рассмотренных типа реакций содержат одинаковую ключевую стадию синтеза мембраносвязанных протонов – диссоциацию электронейтральных кислот Бренстеда на межфазной границе при переходе из гидрофобной фазы в воду с низкой диэлектрической постоянной. Особое внимание в работе обращается на то, что на одной из анализируемых модельных систем мембраносвязанные протоны обеспечивают энергией реакцию синтеза АТР. В обзоре приводятся данные, показывающие, что аналогичный механизм синтеза мембраносвязанных протонов в системе окислительного фосфорилирования осуществляется также на природных мембранах, в частности, на мембранах митопластов и митохондрий. Анализ показал, что энергия окислительных реакций, которая обеспечивает синтез АТР, на промежуточной стадии запасается не только в форме трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода, но также, и может быть даже в первую очередь, в форме фракции ионов водорода, лабильно связанных с поверхностью внутренней мембраны митохондрий. Процесс запасания энергии в митохондриях неразрывно связан с переносом ионов водорода, которые одновременно исполняют две функции. Фракция ионов водорода на поверхности мембраны является переносчиком и носителем свободной энергии и в то же время непосредственным субстратом (рабочим телом), обеспечивающими движение рабочих элементов сложной биологической машины, которой является F₁F₀-ATP-синтаза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембраносвязанный протон, ион водорода, мембрана, митохондрии, окислительное фосфорилирование, суперконденсатор.

DOI: 10.31857/S0320972522020063

введение

В настоящем обзоре проведён анализ данных об участии протона в начальной стадии запасания энергии в митохондриях. Акцент в обзоре сделан на работах, выполненных ранее в нашей лаборатории, однако анализ данных осуществляется с учётом экспериментов других исследовательских групп. Показано, что запасание энергии в митохондриях осуществляется путём реакции связывания ионов водорода с мембраной с образованием фракции мембраносвязанных протонов, обладающих избытком свободной энергии Гиббса, то есть той энергии, которая может быть использована для совершения системой полезной работы. В работе на основе имеющихся опубликованных экспериментальных данных анализируются свойства мембраносвязанных протонов и показывается их участие в реакциях синтеза АТР. Фракция мембраносвязанных протонов, согласно проведённому анализу, обладает свободной энергией в двух формах. Часть этой энергии обусловлена локальным концентрационным потенциалом, создаваемым градиентом ионов водорода в примембранном слое. Другая часть обусловлена особенностями гидратной оболочки Н⁺-ионов, образуемой в процессе их сольватации на межфазной границе. Далее в тексте именно эти компоненты энергии будут подразумеваться под избытком свободной энергии фракции

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; ОКСФОС – окислительное фосфорилирование.

^{*} Адресат для корреспонденции.

мембраносвязанных протонов, а процессы, приводящие к их формированию, подробно проанализированы.

Как известно, П. Митчелл постулировал, что первичным аккумулятором энергии окислительных реакций митохондрий является электрохимический потенциал ионов водорода, который образуется при трансмембранном переносе протонов [1]. Гипотеза Митчелла была многократно экспериментально подтверждена, в частности, работами Skulachev et al. [2], Liberman et al. [3] и Drachev et al. [4], которые доказали присутствие электрического поля на внутренней мембране митохондрий в процессе работы системы окислительного фосфорилирования (ОКСФОС). Одновременно с П. Митчеллом в 1961 г. Р. Вильямс предложил модель протонного сопряжения, в которой начальной стадией запасания энергии является реакция прямого взаимодействия ионов водорода с полупроницаемой мембраной [5]. Позднее Д. Келл в 1979 г. на основе модели П. Митчелла, согласно которой протон, не взаимодействуя с мембраной, пересекает её, предложил свою модель, согласно которой, напротив, протоны взаимодействуют с мембраной и накапливаются в непосредственной близости от неё. Это позволило ему объяснить наблюдаемый на алкалифильных бактериях эффект синтеза АТР при чрезвычайно низком градиенте ионов водорода [6]. Однако следует отметить, что введение в модель Митчелла дополнительной стадии торможения ионов водорода при взаимодействии их с мембраной фактически трансформировало модель Митчелла в модель Вильямса, согласно которой начальной стадией запасания энергии является взаимодействие протона с мембраной. Важно указать, что в алкалифильных бактериях, согласно модели Келла, система ОКСФОС функционирует в полном согласии с моделью Вильямса, поскольку начальная стадия взаимодействия протона с мембраной действительно контролирует работу всей системы ОКСФОС. Интересно отметить, что П. Митчелл в одной из своих поздних работ тоже признал, что большая часть протонов локализована в примембранных зонах и лишь незначительная часть протонного тока обеспечивается протонами в объёмной фазе [7].

Для того чтобы реализовалось прямое протонное сопряжение по Вильямсу, ион водорода должен некоторое время удерживаться на мембране, образуя с ней лабильную связь. Впервые эффект связывания ионов водорода с поверхностью мембран был обнаружен на фотосистемах: в работах Юнге на мембранах тилакоидов (согласно [6]) и в работе Драчева и соавт. на родопсиновых бляшках [8]. В нашей лаборатории в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, совместно с лабораторией Института электрохимии РАН на модельной системе было показано, что энергия ионов водорода, образующихся на межфазной границе, может быть использована АТР-синтазой в реакции синтеза АТР [9]. Дальнейшие исследования в ряде лабораторий показали, что связанные с мембраной ионы водорода обладают высокой подвижностью и переносятся вдоль мембранной границы гораздо быстрее, чем обмениваются с водной фазой [10–15]. Так как энергия мембранной фракции протонов достаточна для обеспечения синтеза АТР [9, 16, 17], стадия транспорта протонов вдоль поверхности мембраны, по-видимому, включена в работу суперкомплекса ОКСФОС, содержащего электрон-транспортную систему (за исключением комплекса II) и АТР-синтазу [18].

Несмотря на значительный прогресс, точный механизм удержания протонов на межфазной границе до сих пор является предметом дискуссий [19, 20]. Первая часть настоящего аналитического обзора посвящена в основном описанию реакций мембраносвязанных протонов на модельных системах и в митохондриях. Во второй части дано описание реакций синтеза ATP, протекающих с участием мембраносвязанных протонов.

ОБРАЗОВАНИЕ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ПРОТОНОВ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

В работе рассмотрены три способа синтеза мембраносвязанных протонов, обладающих избытком свободной энергии, но при этом использующих разные внешние источники энергии. Анализ показал, что все три типа реакций протекают в одинаковых условиях - на межфазной границе гидрофобной фазы с водой, то есть в зоне, где вода, как известно, обладает сниженной диэлектрической постоянной [21]. Во всех случаях мембраносвязанные ионы водорода синтезируются из электронейтральных кислот Бренстеда в процессе их диссоциации на границе раздела фаз при переходе из гидрофобной фазы в воду с низкой диэлектрической постоянной, в результате чего вновь образовавшаяся гидратная оболочка протона имеет размер меньший, чем в водной фазе. Первый способ – перенос протона на межфазную границу в процессе K^+/H^+ -обмена на липидном бислое (за счёт использования энергии градиента ионов калия). Второй способ – синтез мембраносвязанных протонов на межфазной границе октанвода в условиях диссоциации кислоты Бренстеда; регистрация синтеза ATP за счёт избытка свободной энергии ионов водорода, связанных с межфазной границей. Третий способ – образование мембраносвязанных протонов (caged-H⁺) в результате гидролиза электрофильных соединений на гидрофобной поверхности на границе раздела. Все эти способы более подробно будут рассмотрены далее.

Анализ показал, что во всех трёх случаях, независимо от источников энергии и природы исходной химической реакции, терминальная стадия синтеза энергизованных мембраносвязанных протонов протекает по одинаковому механизму, и энергия запасается в форме фракции энергизованных протонов. Энергия этой фракции распределена между мембраносвязанными ионами водорода и мембраной.

Для регистрации и измерения величины граничных потенциалов на мембране при образовании фракции мембраносвязанных ионов водорода наиболее часто используют метод компенсации внутримембранного поля [22] и метод регистрации изменений поверхностного заряда (ζ-потенциала) [23, 24]. В последнем случае часто используется прибор Malvern Zetasizer, который сочетает метод электрофореза в переменном электрическом поле с регистрацией скорости движения объекта [23]. Вышеуказанные методы дают различающиеся величины потенциалов, однако из ζ-потенциала может быть рассчитан граничный потенциал по модели Гуи-Чепмена с учётом того, что расстояние от поверхности мембраны до плоскости скольжения для липидных мембран составляет около 0,2 нм [25].

Генерация мембраносвязанных протонов на искусственных бислойных липидных мембранах (БЛМ) с использованием градиента ионов калия. С помощью метода регистрации внутримембранного поля было впервые зарегистрировано образование фракции мембраносвязанных протонов на БЛМ из фосфолипидов [26]. Для наглядной демонстрации этих ключевых экспериментов на БЛМ они будут подробно описаны далее и схематично проиллюстрированы на рис. 1 и 2. Эффект генерации фракции мембраносвязанных протонов был зарегистрирован в условиях индукции К⁺/H⁺-обмена на БЛМ. Для этого был использован электронейтральный К⁺/Н⁺-обменник, нигерицин, со стехиометрией 1:1. В молекуле нигерицина роль переносчика протона выполняет протонированная карбоксильная группа, диссоциация которой происходит на межфазной границе с образованием мембраносвязанного протона. В качестве источника энергии для индукции потока ионов водорода через мембрану был создан высокий градиент ионов калия [26]. Полная схема переноса протона через мембрану с помощью нигерицина при наличии градиента ионов калия представлена на рис. 1. На рисунке также показано, что в этих условиях образуются две фракции ионов водорода – фракция мембраносвязанных протонов на поверхности липидного бислоя и, как отмечалось выше, фракция ионов водорода в так называемом неперемешиваемом слое воды. Толщина неперемешиваемого слоя водной фазы порядка 100 мкм, и его необходимо отличать от межфазной границы вода-мембрана, где находятся мембраносвязанные протоны, и толщина которой составляет всего несколько ангстрем. При К⁺/Н⁺-обмене закисление неперемешиваемого слоя происходит в результате протекания непрерывного процесса отрыва мембраносвязанных ионов водорода от «cis»-поверхности БЛМ.

На рис. 1 показано, что фракция мембраносвязанных протонов возникает и существует как стационарное состояние системы. При этом роль источника энергии выполняет градиент ионов K⁺. Объём этой фракции определяется соотношением скоростей подачи и отрыва Н⁺ионов на «cis»-поверхности БЛМ. Фракция мембраносвязанных протонов является стационарной (но неравновесной) энергозависимой структурой, возникающей в системе «БЛМ/нигерицин/градиент К⁺». Таким образом, весь объём фракции мембраносвязанных протонов, пока существует градиент ионов калия, непрерывно обновляется. При этом в результате отрыва мембраносвязанных протонов от поверхности мембраны поддерживается низкое значение рН в неперемешиваемом водном слое. Повторная гидратация протонов на «cis»-стороне мембраны происходит в гидрофобной фазе примембранного слоя с низкой диэлектрической постоянной [21]. При этом формируется новая гидратная оболочка меньших размеров. Свойства воды на заряженных межфазных границах описаны в работе Gonella et al. [27]. Фракция мембраносвязанных протонов, образовавшаяся в результате переноса нигерицин-Н⁺ через мембрану, на рис. 1 обведена красным овалом.

Для измерения закисления в неперемешиваемом слое у поверхности БЛМ был использован разработанный метод [28], который позволил проводить регистрацию быстрых изменений рН. В систему добавлялся разобщитель (протонофор), который трансформировал локальный градиент рН на БЛМ в электрохимический потенциал ионов водорода, который уже может быстро измеряться потенциометрическим методом. Результаты таких измерений приведены на рис. 2. На рис. 2, *б* приведены



Механизм образования мембраносвязанного протона (H⁺) при переносе через мембрану в присутствии нигерицина (Nig)

Рис. 1. Схема генерации фракции мембраносвязанных протонов на БЛМ на межфазной границе при К⁺/H⁺-обмене на нигерицине. Неравновесно связанные с мембраной протоны имеют изменённую гидратную оболочку (то есть в среднем отличающуюся от таковой в объёме) и обладают избытком свободной энергии. На рисунке фракция этих протонов обведена красным овалом

кривые изменения потенциала, происходящие при изменении активности H⁺ в примембранном слое в присутствии разобщителя.

Такой подход позволил также отделить процесс закисления в примембранном слое от процессов на межфазной границе. Образующийся избыток протонов в неперемешиваемом водном слое препятствовал прямой регистрации фракции мембраносвязанных протонов и исследованию её свойств. Для регистрации вклада фракции мембраносвязанных протонов в граничный потенциал на БЛМ закисление в неперемешиваемом слое необходимо было устранить. Это было достигнуто за счёт создания противоположно направленного потока протонов через мембрану на ацетате (рис. 2, *a*) [29]. Как показали эксперименты, отрицательно заряженный ацетат-анион, как и разобщители, не способен взаимодействовать с мембраносвязанными протонами. Однако при этом ацетат связывается с протонами в неперемешиваемом слое, после чего в нейтральной форме переходит вместе с захваченным протоном через межфазную границу на другую сторону мембраны (рис. 2). Избирательное удаление избытка протонов из неперемешиваемого слоя с помощью ацетата позволило отдельно исследовать фракцию мембраносвязанных протонов, которая не взаимодействует с ацетатом.

Важно указать ещё раз, что эффект образования мембраносвязанных протонов, представленный на рис. 2, был получен в присутствии разобщителя. Этот результат показал, что разобщитель в обычно используемых концентрациях (1–10 мкМ) не рассеивает энергию мембраносвязанных протонов. Для взаимодействия с этой фракцией протонов были синтезированы специальные поверхностно-активные разобщители (более подробно эти соединения обсуждались в обзоре Eremeev и Yaguzhinsky [30]).

Катализ реакции отрыва протона от поверхности мембраны. Как было показано в работе Antonenko et al. [26], в присутствии нигерицина и градиента К⁺ на БЛМ формируется фракция мембранных протонов, которая может быть удалена с поверхности добавлением слабых оснований Льюиса (в концентрации порядка 10 мМ). Поскольку слабые основания, как известно, обладают буферными свойствами, подобные эффекты многие авторы объясняют

Удаление протонов из неперемешиваемого слоя с помощью

действием этих веществ в качестве буферов. Согласно такому объяснению, следовало ожидать, что добавление буферов в систему, представленную на рис. 1, будет уменьшать скачок рН в примембранном слое при K^+/H^+ -обмене. Однако, как показал эксперимент, добавление в систему, представленную на рис. 2, δ , слабого основания Льюиса (цитрата) вызывает прямо противоположный эффект. Добавление цитра-

а

та, напротив, резко увеличивает градиент pH (только в условиях K^+/H^+ -обмена), что свидетельствует об ускорении реакции отрыва мембраносвязанного протона от поверхности бислоя. Это полностью противоречит ожидаемому буферному эффекту цитрата, который должен проявляться как снижение градиента pH. Необходимо отметить, что при повышении концентраций оснований Льюиса иногда мож-



Рис. 2. Метод встречных потоков протонов. a – Схема удаления (путём титрования ацетатом) локального градиента pH, возникающего в неперемешиваемом слое при переносе протонов через мембрану на нигерицине (Nig), с помощью создания противоположно направленного потока протонов. δ – Пример использования потенциометрического метода для регистрации изменений pH в примембранном слое БЛМ в процессе его удаления нарастающими концентрациями ацетата. Величина ΔpH пропорциональна величине мембранного потенциала, возникающего на мембране в присутствии разобщителя (см. выше). Величина первой добавки ацетата, полностью снимающей градиент pH, определена путём титрования в предварительных экспериментах. После удаления «первичного» градиента pH в примембранном слое добавка катализатора отрыва протона (цитрата) повторно создаёт pH-градиент в примембранном слое БЛМ за счёт увеличения скорости V₁. Полное удаление вновь появившегося градиента pH достигается с помощью титрования небольшими порциями ацетата. Рисунок построен по данным работы [31]



Рис. 3. Прямая регистрация с помощью pH-микроэлектрода изменений pH в примембранном слое БЛМ при нарастающей скорости отрыва мембранных протонов (прямое доказательство увеличения скорости отрыва мембранных протонов под действием катализатора – слабого основания Льюиса). Измерения проводились в условиях генерации мембранных протонов на «cis»-стороне БЛМ в присутствии нигерицина и градиента ионов K⁺. Ускорение отрыва протонов с «cis»стороны БЛМ достигалось за счёт увеличения концентрации катализатора отрыва протонов – цитрата. На вставке – возрастание величины потока H⁺-ионов через мембрану (10⁻¹⁰ моль/см²/с) при увеличении концентрации цитрата. Рисунок взят из работы [32] (с разрешения издательства Wiley)

но также наблюдать их слабый буферный эффект. Таким образом, удаление градиента pH в примембранном слое [26] позволило показать присутствие граничного потенциала на БЛМ в условиях K⁺/H⁺-обмена и независимо доказать каталитический механизм реакции отрыва ионов водорода от поверхности мембраны.

Данные работы Evtodienko et al. [32] (рис. 3), в которой при помощи микроэлектрода было проведено прямое измерение рН в примембранном слое БЛМ, также показали, что слабые основания не только не снижают градиент рН, но резко повышают концентрацию ионов водорода в примембранном слое. В этой работе также была измерена скорость трансмембранного потока ионов водорода, которая увеличивалась при добавлении цитрата (вставка на рис. 3), что явно свидетельствует не о буферном, а о каталитическом эффекте слабых оснований. Таким образом, было надёжно зарегистрировано наличие каталитической активности слабых оснований Льюиса в реакции отрыва протона от мембраны. Это является прямым доказательством существования неравновесной фракции связанных с мембраной протонов, которая в форме граничного потенциала запасает энергию градиента ионов калия.

Синтез мембраносвязанных протонов в реакции гидролиза электрофильных соединений (caged-H⁺) в зоне межфазной границы мембранавода. Генерацию мембраносвязанных протонов можно осуществить за счёт высвобождения сильной кислоты при гидролизе caged-H⁺ на межфазной границе. Caged-H⁺ принято называть соединения, относящиеся к классу электрофильных веществ (например, эфиров сульфокислот или галоидалкиламинов), которые на поверхности мембран митохондрий и БЛМ могут гидролизоваться с выделением сильных Н⁺кислот. Высвобождающиеся при этом протоны, как и в случае трансмембранного переноса, какое-то время удерживаются на межфазной границе мембрана-вода. Этот подход был реализован в нашей лаборатории в начале 80-х гг. прошлого века с использованием электрофильных соединений ряда β-галоидалкиламинов, обладающих спонтанной реакционной способностью, гидролиз которых эффективно происходит на межфазной границе мембрана-вода [33]. В результате было показано, что генерация избытка протонов на поверхности внутренней мембраны митохондрий блокирует работу всех трёх протонных помп за счёт резкого повышения локальной активности ионов водорода.

Важность этих результатов в том, что они получены на митохондриях. При этом очевидно, что мембраносвязанные протоны стабилизированы на поверхности митохондриальных мембран и не подвергаются избыточной гидратации и отщеплению от мембраны митохондрий. Эти результаты хорошо согласуются с более поздними работами на модельных мембранах, в том числе с теми, в которых был реализован более удобный и контролируемый вариант caged-H⁺, в которых реакция освобождения ионов водорода индуцируется ультрафиолетовым (УФ) излучением [34]. Результаты, полностью согласующиеся с выводами работ на БЛМ с нигерицином, описанными выше, были независимо подтверждены при генерации мембраносвязанных протонов с помощью высвобождения caged-H⁺ (возбуждения УФ-излучением молекул 2-метокси-5-нитрофенилсульфата) [22]. Во всех случаях регистрировалось образование фракции мембраносвязанных протонов, которая каталитически удалялась с поверхности мембраны слабыми основаниями Льюиса.

Особенно необходимо отметить экспериментальные исследования кинетики диффузии протона вдоль плоской бислойной мембраны, проведённые П. Полем и Ю. Антоненко с соавт., с использованием УФ-активируемых caged-H⁺ [35]. Связанные с мембраной caged-H⁺ высвобождали с помощью УФ-вспышек, и отслеживали их диффузию на различное расстояние в отдалённые области мембраны, которая регистрировалась по флуоресценции встроенного в мембрану рН-зонда. В результате удалось показать высокую подвижность протона на поверхности (одного порядка, но меньшую, чем в объёмной фазе дистиллированной воды), а также то, что расстояние, преодолеваемое протоном вдоль поверхности, снижается при увеличении концентрации мобильных рН-буферов (катализаторов отрыва протонов) [35]. Исследование химически различных бислойных мембран позволило также показать, что быстрая диффузия протонов по поверхности происходит за счёт движения протона по молекулам воды по механизму Гроттгуса [36], а не за счёт скачков между закреплёнными на мембране участками связывания протонов (иммобилизованными рН-буферами), как предполагалось до этого в ряде работ (см. ссылки в [36]).

Эксперименты по исследованию кинетики движения мембраносвязанных протонов позволили также оценить энергию активации отрыва протона от поверхности мембраны в водную фазу для различных липидов и показать, что она на порядок превышает тепловую энергию [15, 36]. Суммарно, согласно выводам авторов этих работ, такая высокая энергия отрыва протонов от поверхности мембраны связана с необходимостью перестройки цепочек водородных связей в больших кластерах молекул воды при удалении протона с межфазной границы [15].

О роли молекул воды в связывании протонов с поверхностью искусственных мембран. С целью выяснения участия молекул воды в образовании связи протонов с поверхностью мембран были проведены эксперименты с использованием тяжёлой воды. В экспериментах на БЛМ с нигерицином, где скорость реакции отрыва мембраносвязанных протонов от поверхности мембраны лимитировала скорость переноса протонов в объём водной фазы, было обнаружено, что в тяжёлой воде скорость потока протонов через мембрану снижается [31]. При малых концентрациях катализатора отрыва протонов (цитрата) изотопный эффект при замене H_2O на D_2O составлял лишь 30%. Однако при высоких каталитических концентрациях (20-100 мМ) наблюдался очень высокий изотопный эффект, который достигал более 400% [31]. Вышеприведённые результаты с нигерицином находятся в согласии с экспериментами на родопсине и цитохром с-оксидазе, в которых присутствовали высокие концентрации катализаторов отрыва протона. Лимитирующая стадия отрыва протона от фермента в водную фазу [37] при замене H₂O на D₂O как в родопсине [38], так и в цитохром с-оксидазе [39, 40] замедляется более чем в пять раз. Наблюдаемые эффекты D₂O однозначно указывает на участие молекул воды в связывании ионов водорода с межфазной границей (вода-липид или вода-белок). Таким образом, было показано, что эффективность катализатора по ускорению процесса переноса иона водорода от поверхности границы раздела в объём водной фазы гораздо ниже в D_2O по сравнению с H_2O .

Снижение скорости реакции отрыва протона в тяжёлой воде лимитировано свойствами кластера тяжёлой воды, который определяет прочность связи иона водорода с межфазной границей и его способность взаимодействовать с молекулой катализатора. Это предположение хорошо согласуется с результатами работы в модельной системе межфазной границы п-декана с водой [41], где показали возможность удержания ионов водорода на межфазной границе и снижение подвижности ионов водорода в тяжёлой воде. Вывод об участии молекул воды в удержании протонов на мембране также делается в работе по изучению латерального переноса протона вдоль мембран [36].

Участие мембраносвязанных протонов в синтезе АТР в модельной системе. Ещё в середине 70-х гг.



Рис. 4. Схема эксперимента по синтезу АТР на межфазной границе октан-вода. Источником ионов водорода на межфазной границе служила кислота Бренстеда (пентахлорфенол). Высвобождение протонов происходило при диссоциации пентахлорфенола в момент контакта с водой. Синтез АТР наблюдался при отсутствии окислительных реакций и при отсутствии трансмембранного потенциала

прошлого века в нашей лаборатории были поставлены эксперименты, в которых для синтеза АТР использовалась сорбированная на межфазной границе октан-вода (со стороны водной фазы) F₁F₀-ATPаза, выделенная из митохондрий сердца быка. В качестве источника энергии для синтеза ATP со стороны гидрофобной фазы добавлялся безводный раствор электронейтральной H⁺-кислоты Бренстеда – пентахлорфенола [9]. В этих экспериментах ионы водорода на межфазной границе образовывались в результате диссоциации пентахлорфенола в момент контакта с водной фазой. Образование ионов водорода происходило в приграничном слое воды, имеющем низкую диэлектрическую постоянную. В таких условиях, как отмечалось в предыдущих модельных экспериментах, на межфазной границе формируется фракция ионов водорода (фракция мембраносвязанных протонов), обладающих избытком свободной энергии (рис. 4). В этих условиях на межфазной границе осуществлялся синтез АТР при отсутствии трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода. Эти эксперименты показали, что объёмные параметры гидратной оболочки иона водорода, образовавшегося в воде с низкой диэлектрической постоянной, действительно невелики и соответствуют диаметру входного протонного канала F₁F₀-ATP-синтазы. Приведённые выше результаты недавно получили надёжное независимое экспериментальное подтверждение в работе Sjöholm et al. [17], в которой на липосомах (со встроенными АТР-синтазой и комплексом IV) было показано, что синтез АТР происходит за счёт фракции мембрано-

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

связанных протонов, которые переносятся вдоль поверхности липосомальной мембраны от респирасом на ATP-синтазу.

ОБНАРУЖЕНИЕ ФРАКЦИИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ПРОТОНОВ НА ПРИРОДНЫХ МЕМБРАНАХ

Фракции мембраносвязанных протонов на поверхности митопластов (митохондриях без внешней мембраны). Можно было ожидать, что при включении протонных помп положительный поверхностный заряд на поверхности митопластов повысится в результате образования фракции мембраносвязанных протонов. Регистрация изменений поверхностного заряда на мембранах митопластов проводилась на приборе Malvern Zetasizer. Было показано, что поверхность мембраны митопластов несёт на себе большой отрицательный заряд, но включение работы протонных помп практически не уменьшает его. Синтез фракции мембраносвязанных протонов был достоверно продемонстрирован в опытах с добавлением катализатора отрыва протона (слабого основания HEPES 20 мМ). Включение протонных помп в присутствии катализатора приводило к достоверному снижению величины отрицательного заряда, что указывало на появление фракции мембраносвязанных протонов на поверхности митопластов [23]. Результаты действия катализатора на заряд митопластов приведены на рис. 5. Наблюдаемый эффект катализа на митопластах показал, что на природных мембранах связь протона с мембраной качественно не отличается от связи мембраносвязанных протонов с БЛМ.

Важно отметить, что при выключенных протонных помпах добавление катализатора отрыва протонов не оказывает влияния на поверхностный заряд митопластов. Это связано с тем, что при неработающих протонных помпах слой противоионов на поверхности мембраны образуется ионами калия (основными катионами в используемой среде измерения), а двойной электрический слой находится в состоянии равновесия. При включении протонных помп ионы калия замещаются ионами водорода, при этом система выходит из состояния равновесия. Состояние с избыточной концентрацией протонов на поверхности мембраны является стационарным и поддерживается работой протонных помп. Добавление катализатора увеличивает скорость отрыва протонов в объёмную фазу воды и смещает стационарное состояние, что и наблюдается как увеличение отрицательного заряда мембраны. Этот эффект не наблюдается в равновесном состоянии (при отсутствии источника энергии).

При исследовании функциональной роли фракции мембраносвязанных протонов было показано, что их удаление с поверхности митопластов с помощью катализатора (HEPES 20 мМ) увеличивало скорость работы протонных помп, оцениваемую по скорости дыхания митопластов (рис. 6). Таким образом, было показано, что фракция мембраносвязанных протонов, связанная с внутренней мембраной митохондрий, исполняет также роль регулятора активности электрон-транспортной цепи системы ОКСФОС.

Наличие этой фракции тормозит работу протонных помп по механизму обратной связи. Аналогичный эффект можно наблюдать также при образовании мембраносвязанных протонов в результате гидролиза caged-H⁺ [33]. Наблюдаемый в этих экспериментах эффект торможения дыхания избытком мембраносвязанных протонов показал, что природа их связи с поверхностью мембраны качественно отличается от связи ионов калия с мембраной в равновесном состоянии. Скорее всего, связь ионов калия с поверхностью митопласта определяется прямым электростатическим взаимодействием катионов с отрицательным зарядом поверхности, в то время как связь протонов с поверхностью митопластов в энергизованной системе близка по своим свойствам к водородной связи. Именно этот тип связи, как показывает эксперимент, чувствителен к действию катализатора.

Из данных рис. 5 и 6 видно, что разобщитель не взаимодействует с мембраносвязанными протонами, но эффективно взаимодействует с ними после их отрыва от мембраны с помощью катализатора. Это обусловлено слабым взаимодействием аниона разобщителя с ионами водорода, которые сорбированы на мембране. Этот эффект наблюдается также при синтезе ATP [9].

Фракции мембраносвязанных протонов на поверхности митохондрий. Внешняя мембрана хорошо проницаема для ионов водорода, и поэтому было необходимо ответить на вопрос о том, существует ли перенос мембраносвязанных протонов между внешней и внутренней мембранами. При этом было обнаружено, что поверхность фосфорилирующих митохондрий, так же,

3-10тенциал, мВ -50-	Различие достоверных различий		Средний ζ-потенциал в эксперименте, мВ			
		Nº	Помпы не работают		Помпы работают	
			3мМ HEPES	20мM HEPES	3 мМ HEPES	20 mM HEPES
		1	-21,9 ±1,1	-22,9 ± 1,5	-22,0 ± 1,4	-23,9 ± 1,6
		2	-22,7 ± 0,9	-22,5 ± 1,1	-23,5 ± 1,3	-26,1 ± 1,4
		3	-21,6 ± 1,8	-22,3 ± 1,1	-20,1 ± 0,6	-24,6 ± 0,9
	4	-22,9 ± 1,3	-24,1 ± 1,2	-22,2 ± 0,9	-26,2 ± 1,4	
[помпы помпы не работают работают	5	-22,8 ± 1,1	-23,2 ± 0,9	-21,3 ± 1,1	-22,9 ± 0,5

Рис. 5. Обнаружение мембраносвязанных протонов, обладающих избытком свободной энергии, на поверхности митопластов в условиях работы протонных помп. В таблице приведены ζ-потенциалы в пяти экспериментах на разных препаратах митопластов по данным работы [23]. На диаграмме показаны усреднённые данные по всем пяти препаратам


Рис. 6. Увеличение скорости дыхания митопластов (скорости функционирования протонных помп) в присутствии классического разобщителя при повышении концентрации катализатора отрыва мембранных протонов HEPES. Рисунок модифицирован по данным работы [23]

как и поверхность митопластов, может нести на себе значительный отрицательный заряд. Эксперименты показали, что перенос мембраносвязанных протонов в нормальных изотонических условиях протекает малоэффективно. Однако межмембранный перенос активируется в условиях слабого осмотического стресса (при 120 мОсм в среде инкубации митохондрий), когда, по данным электронной микроскопии, можно наблюдать стыковку внешней и внутренней мембран, обусловленную набуханием матрикса [24]. Удаление мембраносвязанных протонов с помощью катализатора (HEPES 20 мМ) увеличивает скорость работы протонных помп в препаратах набухших митохондрий [42] аналогично тому, как это происходит на митопластах.

Участие мембраносвязанных протонов в реакциях синтеза АТР в митохондриях. Мембраносвязанные протоны напрямую участвуют в реакциях синтеза АТР [43]. Опыты проводили на интактных митохондриях в гипотонических и изотонических средах, в присутствии и при отсутствии катализатора реакции отрыва мембраносвязанных протонов (HEPES 20 мМ). Результаты этих экспериментов приведены на рис. 7.

Можно видеть, что катализатор резко снижает эффективность функционирования ОКСФОС, уменьшая ADP/O на 20–40%. Эффект наблюдался в условиях гипотонии, но в некоторых

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

экспериментах он появлялся и в изотонических условиях. Эти и ранее описанные данные позволяют сделать заключение о том, что энергия фракции мембранных протонов используется в реакции синтеза ATP при работе OKCФOC. Неустойчивость эффекта вызвана тем, что тоничность среды является не единственным фактором, который контролирует слипание мембран митохондрий и действие катализатора. В связь между протонами и мембранами включены, как было показано выше на модельных системах, молекулы воды, и такого рода связи могут меняться при небольших изменениях внешних условий.

МИТОХОНДРИИ КАК ПРОТОННЫЙ СУПЕРКОНДЕНСАТОР (ИОНИСТОР)

Приведённые ранее данные показывают накопление ионов водорода в двойном электрическом слое на поверхности внутренней мембраны митохондрий. Это даёт возможность сравнить митохондрии с суперконденсатором (ионистором) — техническим устройством, энергия в котором запасается в двойном электрическом слое на границе с электродом [44]. Недавние модельные исследования гидратации фосфолипидов демонстрируют, что ионы на межфазной границе с фосфолипидным бислоем локализо-



Рис. 7. Снижение коэффициента полезного действия (КПД) ОКСФОС при удалении фракции мембраносвязанных протонов с помощью катализатора (HEPES 20 мМ). На диаграмме приведены усреднённые данные из работы [43], полученные на четырёх разных препаратах митохондрий. КПД оценивали по средней величине параметра ADP/O, отражающего количество атомов кислорода, используемое митохондриями для синтеза одной молекулы ATP из ADP и фосфата. За 100% принимали параметр ADP/O = 2, соответствующий теоретическому максимуму при окислении сукцината

ваны не только в слабосвязанном слое Гуи-Чепмена, но и адсорбируются в полярной зоне липидного бислоя вблизи фосфатных групп [45]. Это даёт возможность для образования высокоустойчивых структур, аналогичных таковым в пористых электродах ионисторов. При этом электрический заряд протонов распределён на большой поверхности, а расстояние между разноимёнными зарядами очень мало (менее 3 Å). Важно отметить, что, в отличие от ионистора, где носителями заряда служат любые ионы электролита, в митохондриях идёт процесс трансмембранного переноса протонов (в результате функционирования комплексов дыхательной цепи), в результате чего примембранный слой связанных катионов формируется преимущественно из протонов. Последующий обмен протонов на другие ионы, приходящие из водной фазы, возможен, однако имеет достаточно высокую энергию активации. Именно этот процесс отрыва протонов от мембраны (или обмена на другой ион) катализируется слабыми основаниями. Поскольку протоны, запасённые на межфазной границе, могут использоваться АТР-синтазой для осуществления синтеза АТР [9, 17], такие структуры с высокой электрической ёмкостью могут выполнять функцию промежуточного аккумулятора энергии в митохондриях.

О СВОЙСТВАХ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ПРОТОНОВ

Эффект удержания протонов на межфазной границе наблюдается в условиях связывания ионов водорода на поверхности мембраны митохондрий, митопластов и на модельных системах: на БЛМ и на межфазной границе октанвода. Важнейшей особенностью мембраносвязанных протонов является их способность при отрыве от мембраны непосредственно участвовать в работе ATP-синтазы (ключевой биологической машины) в качестве рабочего тела. В работе дано описание специфических свойств мембраносвязанных протонов.

• Фракция мембраносвязанных протонов формируется в границах двойного электрического слоя и находится в плотном слое противоионов (в пределах внешней плоскости Гельмгольца и плоскости скольжения). При работе протонных помп сохраняется заряд первого слоя противоионов (величина поверхностного заряда митохондрий не меняется), так как ионы водорода замещают в нём ионы калия.

• Фракция мембранных протонов является неравновесной и обладает избытком свободной энергии. Она существует только в условиях генерации протонов на межфазной границе. Это принципиально отличает её от равновесной фракции противоионов слоя Штерна.

• Высокие концентрации мембраносвязанных протонов ингибируют работу протонных помп за счёт формирования запирающего слоя из прочно удерживающихся на межфазной границе ионов водорода.

• Мембраносвязанные протоны способны к быстрому латеральному движению без отрыва в водную фазу (подвижность одного порядка с подвижностью протона в объёме).

• Мембраносвязанные протоны обладают избытком свободной энергии, и поэтому могут быть удалены с мембраны добавлением катализаторов отрыва протонов — высокими концентрациями слабых оснований (буферов HEPES, Tris, MES) или анионов слабых кислот (цитрат).

• Отрыв протонов от мембраны и их латеральный перенос происходят с участием молекул воды.

• Протоны на межфазной границе обладают избытком свободной энергии, которая используется ATP-синтазой в реакции синтеза ATP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ показал, что энергия окислительных реакций, которая используется в синтезе ATP, запасается не только в форме электрохимического потенциала ионов водорода на митохондриальной мембране, но также, а может быть и в первую очередь, в форме фракции ионов водорода, лабильно связанных с поверхностью мембраны. Процесс запасания энергии в митохондриях неразрывно связан с переносом ио-

- 1. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144-148.
- Skulachev, V. P., Sharaf, A. A., and Liberman, E. A. (1967) Proton conductors in the respirator chain and artificial membranes, *Nature*, **216**, 718-719, doi: 10.1038/ 216718a0.
- Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, 222, 1076-1078, doi: 10.1038/2221076a0.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, 249, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
- Williams, R. J. P. (1961) Possible functions of chains of catalysts, *J. Theor. Biol.*, 1, 1-17, doi: 10.1016/0022-5193(61)90023-6.
- Kell, D. B. (1979) On the functional proton current pathway of electron transport phosphorylation: An electrodic view, *Biochim. Biophys. Acta*, 9, 55-99, doi: 10.1016/0304-4173(79)90018-1.
- Mitchell, P. (1991) Foundations of vectorial metabolism and osmochemistry, *Biosci. Rep.*, 11, 297-346, doi: 10.1007/BF01130212.
- Drachev, L. A., Kaulen, A. D., and Skulachev, V. P. (1984) Correlation of photochemical cycle, H⁺ release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, **178**, 331-335, doi: 10.1016/0014-5793(84)80628-6.
- Yaguzhinsky, L. S., Boguslavsky, L. I., Volkov, A. G., and Rakhmaninova, A. B. (1976) Synthesis of ATP coupled with action of membrane protonic pumps at the octane-water interface, *Nature*, **259**, 494-496, doi: 10.1038/259494a0.
- 10. Heberle, J., Riesle, J., Thiedemann, G., Oesterhelt, D., and Dencher, N. A. (1994) Proton migration along the

нов водорода, которые одновременно исполняют две функции — переносчика и носителя свободной энергии протонов и в то же время являются субстратами (рабочими телами), обеспечивающими направленное движение рабочих элементов в сложной биологической машине, которой является F_1F_0 -ATP-синтаза.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00835), а также при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (тематический план «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В рамках настоящей статьи не проводилось каких-либо экспериментов с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

membrane surface and retarded surface to bulk transfer, *Nature*, **370**, 379-382, doi: 10.1038/370379a0.

- Alexiev, U., Mollaaghababa, R., Scherrer, P., Khorana, H. G., and Heyn, M. P. (1995) Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 92, 372-376.
- Gopta, O. A., Cherepanov, D. A., Junge, W., and Mulkidjanian, A. Y. (1999) Proton transfer from the bulk to the bound ubiquinone QB of the reaction center in chromatophores of Rhodobacter sphaeroides: Retarded conveyance by neutral water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13159-13164, doi: 10.1073/pnas.96.23.13159.
- Cherepanov, D. A., Junge, W., and Mulkidjanian, A. Y. (2004) Proton transfer dynamics at the membrane/water interface: dependence on the fixed and mobile pH buffers, on the size and form of membrane particles, and on the interfacial potential barrier, *Biophys. J.*, 86, 665-680, doi: 10.1016/S0006-3495(04)74146-6.
- 14. Medvedev, E., and Stuchebrukhov, A. (2012) Mechanism of long-range proton translocation along biological membranes, *FEBS Lett.*, **587**, doi: 10.1016/j.febslet.2012.12.010.
- Weichselbaum, E., Österbauer, M., Knyazev, D. G., Batishchev, O. V., Akimov, S. A., et al. (2017) Origin of proton affinity to membrane/water interfaces, *Sci. Rep.*, 7, 4553, doi: 10.1038/s41598-017-04675-9.
- Toth, A., Meyrat, A., Stoldt, S., Santiago, R., Wenzel, D., et al. (2020) Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117, 2412-2421, doi: 10.1073/pnas.1917968117.
- Sjöholm, J., Bergstrand, J., Nilsson, T., Šachl, R., Ballmoos, C., et al. (2017) The lateral distance between a proton pump and ATP synthase determines the ATP-synthesis rate, *Sci. Rep.*, 7, 1-12, doi: 10.1038/s41598-017-02836-4.
- 18. Nesterov, S., Chesnokov, Y., Kamyshinsky, R., Panteleeva, A., Lyamzaev, K., et al. (2021) Ordered clusters of the

complete oxidative phosphorylation system in cardiac mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ ijms22031462.

- Morelli, A. M., Ravera, S., Calzia, D., and Panfoli, I. (2019) An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane, *Open Biol.*, 9, doi: 10.1098/rsob.180221.
- Lee, J. W. (2021) Mitochondrial energetics with transmembrane electrostatically localized protons: do we have a thermotrophic feature? *Sci. Rep.*, **11**, 14575, doi: 10.1038/s41598-021-93853-x.
- Teschke, O., Ceotto, G., and de Souza, E. F. (2001) Interfacial water dielectric-permittivity-profile measurements using atomic force microscopy, *Phys. Rev. E*, 64, 011605, doi: 10.1103/PhysRevE.64.011605.
- 22. Ташкин В. Ю., Вишнякова В. Е., Щербаков А. А., Финогенова О. А., Ермаков Ю. А., и др. (2019) Изменение емкости и граничного потенциала бислойной липидной мембраны при быстром освобождении протонов на ее поверхности, Биол. Мемб., 36, 101-108.
- Моисеева В. С, Мотовилов К. А, Лобышева Н. В, Орлов В. Н, Ягужинский Л. С. (2011) Образование метастабильной связи ионов водорода с поверхностью митопластов, Доклады Академии Наук, 438, 555-558.
- 24. Eroshenko, L. V., Marakhovskaya, A. S., Vangeli, I. M., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., et al. (2012) Bronsted acids bounded to the mitochondrial membranes as a substrate for ATP synthase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **444**, 158-161.
- Ermakov, Y. A., and Nesterenko, A. M. (2017) Boundary potential of lipid bilayers: Methods and interpretations, *J. Phys. Conf. Ser.*, **780**, 012002, doi: 10.1088/1742-6596/780/1/012002.
- Antonenko, Y. N., Kovbasnjuk, O. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1993) Evidence in favor of the existence of a kinetic barrier for proton transfer from a surface of bilayer phospholipid membrane to bulk water, *Biochim. Biophys. Acta*, **1150**, 45-50, doi: 10.1016/0005-2736(93)90119-K.
- Gonella, G., Backus, E. H. G., Nagata, Y., Bonthuis, D. J., Loche, P., et al. (2021) Water at charged interfaces, *Nat. Rev. Chem.*, 5, 466-485, doi: 10.1038/s41570-021-00293-2.
- Antonenko, Yu. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1982) Generation of potential in lipid bilayer membranes as a result of proton-transfer reactions in the unstirred layers, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 14, 457-465, doi: 10.1007/ BF00743071.
- Antonenko, Y. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1990) Effect of changes in cation concentration near bilayer lipid membrane on the rate of carrier-mediated cation fluxes and on the carrier apparent selectivity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1026**, 236-240, doi: 10.1016/0005-2736(90)90069-Z.
- Eremeev, S. A. and Yaguzhinsky, L. S. (2015) On local coupling of electron transport and ATP-synthesis system in mitochondria. Theory and experiment, *Biochemistry Moscow*, 80, 576-581, doi: 10.1134/S0006297915050089.
- Kovbasnjuk, O. N., Antonenko, Y. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1991) Proton dissociation from nigericin at the membrane-water interface, the rate-limiting step of K⁺/H⁺ exchange on the bilayer lipid membrane, *FEBS Lett.*, 289, 176-178, doi: 10.1016/0014-5793(91)81063-E.

- Evtodienko, V. Y., Antonenko, Y. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1998) Increase of local hydrogen ion gradient near bilayer lipid membrane under the conditions of catalysis of proton transfer across the interface, *FEBS Lett.*, **425**, 222-224, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00233-6.
- Драгунова С. Ф., Красинская И. П., Ягужинский Л. С. (1981) Регуляция переноса протона через двойной электрический слой на мембране митохондрий, *Биохимия*, **46**, 1087-1095.
- Geißler, D., Antonenko, Y. N., Schmidt, R., Keller, S., Krylova, O. O., et al. (2005) (Coumarin-4-yl)methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 1195-1198, doi: 10.1002/ anie.200461567.
- Serowy, S., Saparov, S. M., Antonenko, Y. N., Kozlovsky, W., Hagen, V., et al. (2003) Structural proton diffusion along lipid bilayers, *Biophys. J.*, 84, 1031-1037.
- Springer, A., Hagen, V., Cherepanov, D. A., Antonenko, Y. N., and Pohl, P. (2011) Protons migrate along interfacial water without significant contributions from jumps between ionizable groups on the membrane surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14461-14466, doi: 10.1073/ pnas.1107476108.
- Zaslavsky, D., Sadoski, R. C., Rajagukguk, S., Geren, L., Millett, F., et al. (2004) Direct measurement of proton release by cytochrome c oxidase in solution during the F→O transition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10544-10547, doi: 10.1073/pnas.0401521101.
- Le Coutre, J., and Gerwert, K. (1996) Kinetic isotope effects reveal an ice-like and a liquid-phase-type intramolecular proton transfer in bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, 398, 333-336, doi: 10.1016/S0014-5793(96)01254-9.
- Salomonsson, L., Brändén, G., and Brzezinski, P. (2008) Deuterium isotope effect of proton pumping in cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 343-350, doi: 10.1016/j.bbabio.2007.09.009.
- Salomonsson, L., Faxén, K., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005) The timing of proton migration in membranereconstituted cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 102, 17624-17629, doi: 10.1073/pnas.0505431102.
- Zhang, C., Knyazev, D. G., Vereshaga, Y. A., Ippoliti, E., Nguyen, T. H., et al. (2012) Water at hydrophobic interfaces delays proton surface-to-bulk transfer and provides a pathway for lateral proton diffusion, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 109, 9744-9749, doi: 10.1073/pnas.1121227109.
- 42. Yurkov, V. I., Fadeeva, M. S. and Yaguzhinsky, L. S. (2005) Proton transfer through the membrane-water interfaces in uncoupled mitochondria, *Biochemistry Moscow*, **70**, 195-199, doi: 10.1007/s10541-005-0101-8.
- Солодовникова И. М., Юрков В. И., Тоньшин А. А., Ягужинский Л. С. (2004) О локальном сопряжении процессов дыхания и фосфорилирования в митохондриях печени крысы, Биофизика, 49, 47-56.
- 44. Conway, B. E. (1999) *Electrochemical Supercapacitors: Scientific Fundamentals and Technological Applications*, Springer Science & Business Media, New York.
- 45. Deplazes, E., White, J., Murphy, C., Cranfield, C. G., and Garcia, A. (2019) Competing for the same space: Protons and alkali ions at the interface of phospholipid bilayers, *Biophys. Rev.*, **11**, 483-490, doi: 10.1007/s12551-019-00541-2.

MECHANISM OF ENERGY STORAGE AND TRANSFORMATION IN MITOCHONDRIA AT THE WATER-MEMBRANE INTERFACE

Review

S. V. Nesterov^{1,2}, E. G. Smirnova³, and L. S. Yaguzhinsky^{2,3,4*}

 ¹ National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia
 ² Moscow Institute of Physics and Techonology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia
 ³ Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: yag@genebee.msu.ru
 ⁴ Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, 115404 Moscow, Russia

In this analytical review various methods for the generation of membrane-bound protons with the use of different energy sources were considered at model and natural systems. The analysis showed that all three considered types of reactions contain the same key stage of membrane-bound protons synthesis. It is the dissociation of electrically neutral Brønsted acids at the interface during the transition from hydrophobic phase to water with a low dielectric constant. Particular attention is paid to the fact that in one of the analyzed model systems, membrane-bound protons provide energy for the ATP synthesis reaction. The review provides data showing that a similar mechanism for the synthesis of membrane-bound protons was also carried out on natural membranes of the OXPHOS system, in particular, on the membranes of mitoplasts and mitochondria. The analysis showed that the energy of oxidative reactions, which provides the synthesis of ATP, at the intermediate stage is stored not only in the form of the transmembrane electrochemical potential of hydrogen ions. It is also and perhaps even primarily, stored in the form of hydrogen ions function bounded to the inner mitochondrial membrane. The process of energy storage in mitochondria is linked with the transfer of hydrogen ions, which simultaneously perform two functions. The fraction of hydrogen ions on the membrane surface is a free energy carrier and, at the same time, a direct substrate (working body) providing the movement of F_1F_0 -ATP-synthase biological machine.

Keywords: membrane bound proton, hydrogen ion, membrane, mitochondria, oxidative phosphorylation, supercapacitor УДК 575.113

ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ НИЗШИХ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ НА ПРИМЕРЕ СТРЕКАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Обзор

© 2022 Т.В. Ерофеева^{1,2}, А.П. Григоренко^{1,2*}, Ф.Е. Гусев^{1,2}, И.А. Косевич^{1,3}, Е.И. Рогаев^{1,2,3,4}

¹ Научный центр генетики и наук о жизни, направление генетика, АНО ВО «Научно-технологический университет "Сириус"», 354349 Краснодарский край, Сочи, Россия; электронная почта: anast1998@mail.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

⁴ Медицинская школа Чен Массачусетского университета, департамент психиатрии, 01545 Шрусбери, США

Поступила в редакцию 28.10.2021 После доработки 13.12.2021 Принята к публикации 17.01.2022

Исключительный набор особенностей и характеристик представителей типа Cnidaria (Стрекающие) делает их модельным объектом для широкого круга исследований. Особый научный интерес представляют пластичность жизненного цикла и связанные с ним процессы клеточной дифференцировки и развития целостного многоклеточного организма. Новый уровень развития молекулярно-генетических методов, в том числе использование методов широкомасштабного секвенирования геномов, транскриптомов и эпигеномов, как на уровне целого организма, так и на уровне отдельных клеток, делает возможным получение детальной картины развития этих животных. В представленном обзоре рассматриваются современные подходы и достижения с использованием методов широкомасштабного секвенирования в реконструкции процессов онтогенеза Cnidaria путём изучения регуляторных путей клеточной трансдукции и их взаимодействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Cnidaria, развитие, методы секвенирования, геномика, сигнальные каскады. **DOI:** 10.31857/S0320972522020075

введение

Многоклеточные организмы, содержащие различные дифференцированные типы клеток, подразделяются на низшие и высшие. К «низшим многоклеточным» относят пластинчатых (Placozoa), губок (Porifera), гребневиков (Ctenophora) и стрекающих (Cnidaria), в то время как к «высшим» относят всех трехслойных билатерально-симметричных многоклеточных жи-

* Адресат для корреспонденции.

вотных (Bilateria) [1]. Cnidaria, являясь двухслойными (Diploblastica) по организации животными, обладают отличительной морфологической характеристикой - наличием специализированных стрекательных клеток, «книдоцитов», которые используются для захвата добычи, защиты и передвижения [2]. Разнообразные представители Cnidaria – коралловые полипы, актинии, сцифо- и гидромедузы, жгучие сифонофоры типа Португальского кораблика и морские осы из группы кубомедуз представляют собой заметную и важную часть экосистем океанов и морей. Отдельную немаловажную роль играют представители актиний и кораллов и их эндосимбионты одноклеточные водоросли. Успешный симбиоз обусловливает рост и выживание рифовых кораллов в неблагоприятных условиях с обеднённым содержанием питательных веществ [3]. В свою очередь, кораллы вступают в симбиоз с макроорганизмами, обеспечивая безопасную среду обитания для большого количества морс-

Принятые сокращения: ATAC-seq – анализ доступного для транспозазы хроматина с использованием секвенирования (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing); ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing); MARS-Seq – массивное параллельное секвенирование транскриптомов единичных клеток (Massively parallel single cell RNA-Seq); scRNA-seq – секвенирование транскриптомов единичных клеток (single cell RNA-sequencing); UMI – уникальный молекулярный идентификатор (Unique molecular identifier).

ких животных (рыбы, двустворчатые моллюски, ракообразные) [4]. Согласно систематике международной базы данных WoRMS, сложная филогенетическая организация Cnidaria в настоящее время характеризуется делением на следующие классы: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Myxozoa, Scyphozoa и Staurozoa [5].

Стрекающие являются объектом активного научного изучения. Относительная простота организации, высокая способность к регенерации, пластичность жизненного цикла и сложная филогенетическая структура делают Cnidaria уникальными представителями мировой фауны. Исследования, связанные с изучением транскриптомов и эпигеномов, позволяющие охарактеризовать как целый организм, так и его клеточное строение, демонстрируют сложную организацию представителей Cnidaria со специфичными особенностями строения и онтогенеза.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТИПА СТРЕКАЮЩИХ

Тип Стрекающие (Cnidaria) объединяет разнообразных представителей водной среды обитания с преобладанием внешней радиальной симметрии, рассматриваемый как сестринская группа билатерально-симметричных животных. Стрекающие – это двухслойные животные, находящиеся на уровне эпителиальной организации [6]. Их тело построено двумя эпителиями – эпидермой и гастродермой, которые разделены межклеточным матриксом или мезоглеей. У Стрекающих отсутствуют органы. Пищеварительная система представлена ротовым отверстием, которое ведёт в единую замкнутую гастральную полость. Гастральная полость может быть представлена сложно-разветвлённой системой каналов и называется гастроваскулярной системой [7]. Ротовое отверстие – единственное отверстие пищеварительной системы, используемое как для заглатывания пищи, так и для выброса непереваренных остатков. Самым важным отличительным признаком Стрекающих является наличие стрекательных клеток или книдоцитов со специализированными органеллами, которые представляют собой капсулы с выстреливающими нитями, использующимися для охоты, защиты и прикрепления [2]. Книдоциты вместе с сенсорными клетками, которые имеют чувствительные реснички на апикальных частях, выходящих на поверхность эпителиев, и сетью ганглиозных клеток формируют нервную систему Стрекающих, которая различается по строению в зависимости от жизненной формы организма [8, 9]. У свободноплавающих медуз по краю колокола имеются нервные кольца,

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

состоящие из нейритов (отростков нейронов), кроме того, у многих медуз есть специализированные органы чувств - светочувствительные глазки и органы равновесия [10, 11]. У прикреплённых полипов нервная система организована как сеть из нейронов, располагающаяся в основании эпителиев по всему телу, с некоторой концентрацией нейронов в оральной и аборальной областях [10, 11]. Определённая регионализация нервной системы, связанная с формированием мезентериальных нервных тяжей (располагающихся вдоль энтодермальных септ-мезентерий), как у полипов Anthozoa [12], и нервных колец, как у некоторых *Hydra* и медуз, наблюдается у Стрекающих, что, однако, не нарушает основной принцип организации нервной системы для этого типа [13]. Движение представителей Стрекающих обеспечивается наличием эпителиально-мышечных клеток с сократительными отростками в базальной части. Эти клетки составляют основу обоих эпителиев. Сократительные отростки эпителиально-мышечных клеток эпидермы и гастродермы полипов относятся преимущественно к гладкому типу. У медуз на внутренней стороне колокола сократительные отростки эпителиально-мышечных клеток относятся к поперечнополосатому типу [14]. Существуют вариации строения мышечной системы у Стрекающих, подробно описанные в обзоре Leclère и Röttinger [14]. Здесь следует упомянуть несколько особенностей строения в разных группах Стрекающих. У многих Hydrozoa в щупальцах энтодермальные эпителиальные клетки не содержат миофиламентов, а у многих полипов Medusozoa имеются мощные продольные сократительные пучки эктодермального происхождения, миоциты которых полностью располагаются в мезоглее и не связанны ни с одним из эпителиев стенки тела. [14]. У Scyphozoa, как правило, отсутствуют миофибриллы во внешнем слое колокола (эксумбрелле) [15]. У большинства Anthozoa, в отличие от Medusozoa, хорошо развиты эпителиально-мышечные клетки энтодермы, составляющие круговую мускулатуру стенки тела, продольные париетальные мышцы у основания септ и ретракторные мышцы на одной стороне каждой септы. А эктодермальные мышцы большинства Anthozoa развиты лишь в зоне щупалец и ротового отверстия. Кроме того, на примере Nematostella vectensis было показано наличие в щупальцах мышечных клеток, обособленных от эпителия в отдельный слой клеток, не несущий эпителиальной функции [16]. У паразитических Endocnidozoa отсутствуют эпителиально-мышечные клетки: миоциты (гладкомышечного типа) расположены отдельно от эпителия в мезоглее [17].



Рис. 1. Филогенетическое дерево, отображающее топологию основных классов Стрекающих, построенное на основании последних опубликованных данных полногеномного секвенирования [18, 19, 21]

Тип Стрекающие представлен следующими классами: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Myxozoa, Scyphozoa, Staurozoa [5]. Филогенетическая структура Cnidaria является предметом дискуссий, но, по последним данным, она описывается делением на 3 монофилетические группы – Anthozoa (шести- и восьмилучевые кораллы, актинии), Medusozoa, объединяющая классы Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa и Staurozoa, и Endocnidozoa, объединяющая паразитических Мухоzoa и Polypodiozoa (рис. 1) [18–21].

Стрекающие демонстрируют большое разнообразие жизненных циклов, отличающихся у разных групп. У Anthozoa полипоидная стадия формирует гаметы, и жизненный цикл включает стадии зародыша → личинки (планулы) → репродуктивного полипа. Медузоидная стадия в жизненном цикле Anthozoa отсутствует. У представителей Medusozoa жизненный цикл осуществляется по схеме: полипоидная стадия (которая размножается только вегетативным путём) → медузоидная стадия (формирующая половые продукты) -> гаметы -> зародыш → планула → полип. Исключение составляет *Hydra*, у которой отсутствуют стадии медузы и планулы, и которая размножается преимушественно вегетативным путём (почкованием), а половое размножение реализуется по схеме: гаметы (развивающиеся в основании эпидермы) \rightarrow зародыш \rightarrow новый полип [22]. Существуют и отклонения от общей схемы жизненного цикла. Например, у Hydrozoa могут быть редуцированы стадии полипа или медузы. Так, у подкласса Trachylina полипы либо очень маленького размера, либо отсутствуют [23]. В то же время у представителей подкласса Hydroidolina может отсутствовать стадия медузы (например, у некоторых Leptothecata [24]). У ряда представителей семейств Bougainvillidae, Hydractiniidae и Rathkeidae вегетативное размножение может происходить не только на стадии полипа, но и на стадии медузы [25]. У некоторых сцифоидных медуз в жизненном цикле также отсутствует стадия полипа, например, у Pelagia [26]. Паразитические Endocnidozoa включают животных с разнообразными жизненными циклами. Мухогоа - это микроскопические эндопаразиты, колонизирующие беспозвоночных и позвоночных, жизненный цикл которых реализуется с участием двух хозяев. Polypodiozoa проходят в жизненном цикле через свободноживущую стадию и паразитических личинок осетровых рыб, соответственно, имеют одного хозяина в жизненном цикле [17].

Отдельного рассмотрения заслуживает онтогенез представителей Medusozoa. Помимо описанного выше классического жизненного цикла, у них было обнаружено уникальное явление «обратного развития», которое заключается в переходе организма определённой стадии жизненного цикла не в следующую, а в предыдущую стадию («возврат к предыдущей стадии»). Считается, что данный процесс вызывается стрессовыми ситуациями, например голоданием или изменением условий среды обитания. «Обратное развитие» было зафиксировано у нескольких представителей Hydrozoa на медузоидной стадии [25]. Одним из самых известных исследований является эксперимент с гидромедузами *Turritopsis* spp. (Hydrozoa), в котором в результате воздействия факторов, вызывающих стресс, таких как резкое повышение температуры, изменение солёности воды или механическое повреждение колокола медузы, организм половозрелой медузы регрессировал и образовывал шарообразное скопление клеток (цисту), из которого впоследствии формировался новый полип [27]. Недавно подобное явление «обратного развития» было описано и для сцифомедуз (Scyphozoa) Aurelia aurita [28].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫЕ В ПРОЦЕССАХ РАЗВИТИЯ У СТРЕКАЮЩИХ

Закладка орально-аборальной оси, формирование разных типов тканей и органов, про-

цессы регенерации, бесполое и половое размножение регулируются клеточными молекулярными каскадами, среди которых ряд сигнальных путей, являющихся эволюционно консервативными для Стрекающих и билатерально-симметричных животных (Bilateria). Рядом исследований было показано, что у Стрекающих присутствуют сигнальные пути, которые также регулируют раннее эмбриональное развитие у Bilateria. К таким ключевым сигнальным клеточным путям относятся: Wnt-, Hedgehog-, Notch-, TGF-β- и RTK-путь [29]. В данном разделе будут рассмотрены молекулярно-генетические характеристики структуры сигнальных путей и их роль в развитии различных представителей Стрекающих.

Большое количество научных исследований, связанных с изучением молекулярных сигнальных каскадов в онтогенезе Стрекающих, демонстрирует эволюционную консервативность этих путей у Cnidaria и высших Metazoa. Данные по секвенированию геномов, транскриптомов и функциональные исследования роли путей клеточной трансдукции в развитии Стрекающих показывают, что основные компоненты перечисленных выше сигнальных путей открыты практически в каждом классе Cnidaria. Здесь нужно отметить, что наибольшее количество исследований структуры молекулярных каскадов проведено на активно использующихся в научных экспериментах моделях Anthozoa и Hydrozoa. В геномах Hydra и N. vectensis были найдены все вышеперечисленные сигнальные пути [30, 31]. В базе данных генов и геномов KEGG, объединяющей геномную и системную функциональную информацию о разных организмах, можно найти подробные схемы сигнальных путей Wnt, Notch и TGF-β у *Hydra* и N. vectensis [32]. У Scyphozoa молекулярная структура различных каскадов детектируется наличием отдельных компонентов путей на геномном уровне [33, 34], при этом в работе Brekhman et al. [35] предложена модель пути Wnt/β-catenin y A. aurita. Меньше всего информации о структуре сигнальных путей имеется по представителям Cubozoa и Staurozoa [33, 36, 37]. B геномах паразитических стрекающих Мухоzoa, в отличие от других классов Cnidaria и паразитических Polypodiozoa (сестринский таксон Мухогоа с типичным для свободноживущих Стрекающих строением тела), отсутствуют полноценные сигнальные каскады, связанные с процессами дифференцировки, развития и межклеточных коммуникаций [18]. Среди компонентов Wnt-пути у них обнаружены только некоторые эффекторные белки, а также некоторые элементы сигнальных путей Hedgehog и

Polypodiozoa) присутствуют ключевые составля ющие пути передачи сигналов Notch [18]. Авто ры предполагают, что основной причиной отсут ствия полноценных сигнальных путей разви тия является уменьшение размера генома в свя зи с переходом к паразитизму. Эксперименталь ные данные по функциям вышеупомянутых
 сигнальных каскадов у паразитических Cnidaria
 отсутствуют. Имеющиеся данные демонстриру ют эволюционную консервативность сигнальных каскадов, задействованных в развитии
 Системы сигнальных каскадов играют важ ную роль в процессах клеточной лифференци-

TGF-β (таблица). У обоих классов (Мухогоа и

ную роль в процессах клеточной дифференцировки и развития живого организма. Далее будет рассмотрена функциональная роль каждого молекулярного пути в ключевых биологических процессах развития разных Стрекающих.

Формирование осевого паттерна вдоль орально-аборальной оси и образование вторичной оси. Среди Стрекающих обнаруживаются как животные с радиальной симметрией, имеющие одну ось полярности (большая часть Hydrozoa и Medusozoa), так и организмы с элементами билатеральной симметрии (кораллы и актинии Anthozoa) с направляющей осью симметрии, перпендикулярной орально-аборальной оси тела. Например, у *N. vectensis* вторичная ось тела определяется щелевидной формой глотки и ассиметричным расположением ретракторных мышц на септах [38]. Однако вопрос о гомологичности данного варианта билатеральной симметрии таковому у Bilateria остаётся открытым [39-43]. Эволюционно консервативной сигнальной системой, определяющей общность развития Стрекающих и высших Metazoa, является молекулярный путь Wnt, который опосредует формирование осевого паттерна вдоль орально-аборальной оси тела в раннем эмбриогенезе [43-47]. Впервые это было показано на примере *Hydra*: после выделения ортологов основных компонентов канонического сигнального пути Wnt/β-catenin с помощью гибридизации in situ определили участки локальной экспрессии ортологов лиганда Wnt3 и эффекторного транскрипционного фактора Tcf/Lef в апикальных частях у взрослых полипов и у вновь образующихся в процессе почкования. Экспрессия гена β -catenin была повышенной в зоне образования будущей почки - месте закладки вторичной оси тела, а ортологов белка Dishevelled гликогенсинтазы-3 и киназы (GSK3) – конститутивно на низком уровне по всему телу *Hydra*. Формирование апикальной части *Hydra* сопровождалось экспрессией *Wnt* и Tcf/Lef и в процессе регенерации головы, и в

ЕРОФЕЕВА и др.

Сигнальный путь/Класс (представители)	Hydrozoa						
	<i>Hydra</i> sp.	Medusozoa (Hydractinia, Clytia hemisphaerica, Cladonema pacificum, Podocoryne carnea, Dynamena pumila, Ectopleura larynx)	Scyphozoa (Aurelia, Nemopilema)	Anthozoa (Nematostella vectensis)	Cubozoa (Morbakka virulenta)	Myxozoa (Kudoa iwatai, Myxobolus cerebralis)	Polypodiozoa (Polypodium hydriforme)
Wnt	[30, 47–53, 79, 83, 110–115, 118, 131, 169, 181]	[45, 46, 67, 68, 78, 87, 89, 123, 124, 135, 138, 139, 144, 188]	[45, 46, 67, 68, 78, 87, 89, 123, 124, 135, 138, 139, 144, 188]	[33-35, 100]	[33]	лиганды и рецеп- торы пути утраче- ны, но есть экс- прессия эффектор- ных белков канони- ческого и некано- нического путей	[18]
Hedgehog	[30, 119]	[89]	[89]	[100]	нет данных	[18]	[18]
Notch	[30, 54, 84, 117]	[99, 188]	[99, 188]	нет данных	нет данных	[18]	[18]
TGF-β	[30, 85, 118, 131, 181]	[89, 188]	[89, 188]	[33, 100]	[36]	[18]	[18]
RTK	[30, 86, 106, 118, 131, 181, 191]	[125, 137]	[125, 137]	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных

Сигнальные пути и гомологи белков, задействованные в процессах развития у различных представителей Cnidaria

Примечание. Таблица составлена по данным экспрессии, геномным и функциональным данным и базе данных КЕGG [32].

процессе de novo образования головной части в клеточных агрегатах из диссоциированной клеточной суспензии [47]. Дальнейшие функциональные исследования на *Hydra* определили ключевую роль пути Wnt в процессе формирования орально-аборальной оси тела с определением апикальной части организма - головного организатора и вторичной оси тела, предшествуюшей эвагинации почек [48–53]. Кроме того, в процессе организации головной части *Hydra*, участвующей в формировании оси тела, также может быть задействован сигнальный путь Notch, регулирующий работу генов лигандов (Wnt7) и транскрипционных факторов-мишеней пути Wnt (Sp5 и Tcf) [54]. Анализ дифференциальной экспрессии генов по всему геному Hydra после фармакологического ингибирования каскада Notch выявил снижение экспрессии Wnt7, Tcf и Sp5 с последующим восстановлением до нормального уровня после удаления ингибитора Notch [54].

Исследования формирования орально-аборальной оси тела на других моделях Стрекающих также демонстрируют важную роль молекулярного каскада Wnt. Изучение эмбриогенеза представителя Anthozoa N. vectensis выявило определённые закономерности формирования первичной оси тела, схожие с *Hydra*, но со своими особенностями: большое разнообразие ортологов лигандов Wnt (подсемейства генов WntA и Wnt1-11) экспрессировалось вдоль оси планулы с ограничением экспрессии около бластопора в процессе гаструляции и в зоне ротового участка у полипов. Экспрессия лигандов Wnt была ограничена одним слоем ткани (эктодермой или энтодермой) [55]. Дальнейшие исследования определили, что лиганды Wnt, Dsh a также β-catenin, являются основными регуляторами развития осевого паттерна N. vectensis в раннем эмбриогенезе и в регенеративных процессах [43, 44, 56-59]. β-Catenin, локализующийся в ядрах клеток бластомеров, демонстрирует первый молекулярный сайт осевой ассиметрии на стадии бластулы [56]. Dsh, стабилизирующий β-catenin, локализуется в анимальном полюсе ооцита, дающем начало закладки орального полюса взрослого организма, и затем в бластомерах [57]. В установлении осевого паттерна у *N. vectensis* на стадии планулы также включается консервативная система генов гомео-

боксовых транскрипционных факторов Нох, важных регуляторов позиционной идентичности вдоль передне-задней оси билатерий [44]. Филогенетически среди *Hox*-генов *N. vectensis* представлены передние (NvAx6, NvAx6a, NvAx7 и NvAx8) и центральные-задние (NvAx1, NvAx1a) гены [44]. NvAx6 и NvAx1 экспрессируются в оральной и аборальной областях соответственно, в процессе эмбрионального развития N. vectensis, что, возможно, опосредует регуляцию формирования основной оси тела с участием передачи сигнала Wnt [44]. NvAx1a, NvAx6a, NvAx7, NvAx8 и NvAx8a, а также Gbx (ген подкласса Hoxlike) экспрессируются вдоль направительной оси [42, 60] с задействованием каскада ВМР в регуляции паттерна направительной оси [61]. Показано, что, помимо Wnt-пути, в формировании осевого паттерна в процессе развития N. vectensis задействованы сигнальные каскады FGF, TGF-β и Hedgehog [62]. TGF-β-каскад через передачу сигнала ВМР задействован и в формировании направляющей оси тела N. vectensis [59, 61, 63, 64], зависящей также от работы Wnt-каскада до установления направляющей оси [59, 65].

Отдельные компоненты пути Wnt определяют развитие осевого паттерна в раннем эмбриогенезе и поддержание осевой идентичности в процессе онтогенеза у представителей гидроидных медуз (лиганды Wnt, рецептор Frizzled, Tcf) [45, 66–68]. Для представителей сцифоидных медуз рода *Aurelia* была показана неоднородная экспрессия лигандов Wnt на разных стадиях жизненного цикла: со спецификой для стадии полипа и тканеспецифичной экспрессией лигандов на стадии медузы, что демонстрирует консервативный механизм определения передне-задней оси тела и тканевой идентичности [33].

Регуляция сегрегации зародышевых листков. Процесс образования зародышевых листков, являющийся ключевым этапом эмбриогенеза для всех Metazoa, ассоциирован с гаструляцией. У Стрекающих гаструляция опосредует образование двух слоёв клеток тела - эктодермы и энтодермы. В общем случае инициация формирования зародышевого слоя начинается с определения эмбрионального участка начала сегрегации и определения тканевой идентичности листка (определение клеточной судьбы), сопровождающегося морфогенетическими движениями энтомезодермы (участка, отделённого от эктодермы и недифференцированного в энто- или мезодерму) [69]. С подробным описанием механизмов гаструляции у разных Стрекающих можно ознакомиться в обзорах Technau [69], а также Kraus и Markov [70]. В данном подразделе будет рассмотрена роль сигнальных каскадов в регуляции гаструляции.

Из всех изучаемых Стрекающих больше всего исследований молекулярной регуляции гаструляции посвящено Anthozoa. Подробные функциональные исследования N. vectensis выявили, что в процессе гаструляции активно работает сигнальный каскад Wnt, который также детерминирует формирование первичной оси у планулы, что связано с экспрессией множества Wnt-лигандов в зоне бластопора (эктодерме или энтодерме после завершения гаструляции) [55]. Разные компоненты канонического и неканонического сигнальных путей Wnt опосредуют процессы спецификации энтодермы [57], формирования паттерна будущих энтомезодермальных и эктодермальных клеток с участием сигнальных каскадов BMP, FGF [71] и Hedgehog [72], образования архентерона и определения клеточной судьбы во время гаструляции [73], а также формирования паттерна орального полюса [58, 65]. Ингибирование канонического пути Wnt за счёт прямого отключения трансляции β-catenin полностью блокировало гаструляцию [56, 74], однако нокдаун гена, кодирующего транскрипционный фактор Tcf, не влиял на прохождение гаструляции, но предотвращал образование нормальной глотки [71]. Важным моментом является то, что образование архентерона, регулирующееся путём Wnt/PCP, может происходить независимо от энтомезодермальной спецификации судьбы клеток, регулирующейся каскадом Wnt/β-catenin, что говорит о независимой эволюции этих двух процессов [75].

У гидроидных распространены различные пути гаструляции, однако даже в случае аполярного пути, характеризующегося отсутствием выраженной морфологической полярности эмбриона [70], на уровне гаструлы формируется паттерн орально-аборальной оси, детерминирующийся градиентом сигнального каскада Wnt [46]. В то же время у некоторых гидроидных морфогенетические процессы гаструляции и спецификации клеточной судьбы не связаны с молекулярной осью, опосредованной передачей сигнала Wnt [76, 77]. Удлинённая форма планулы у гидроидной медузы Clytia образуется во время гаструляции и опосредуется Wnt/PCPкаскадом [78]. Функциональная роль Wnt-пути в эмбриогенезе *Hydra*, в отличие от взрослого полипа, пока не установлена, однако показана экспрессия ортологов *Frizzled*, β -catenin и *Tcf*, но не лиганда Wnt, транскрипты которого детектируются после завершения гаструляции. *β-Catenin* и Tcf экспрессируются равномерно по всему эмбриону [79].

Регуляция образования половых клеток. Стрекающие демонстрируют большое разнообразие жизненных циклов и связанных с ними репродуктивных систем [80]. Различные сигнальные каскады задействованы в процессе образования половых клеток. У *Hydra* гаметогенез начинается в субпопуляции интерстициальных стволовых клеток в эктодерме. В процессе оогенеза после нескольких этапов делений интерстициальных клеток с образованием кластеров, а затем единого клеточного агрегата определяется единственный ооцит. Оставшиеся клетки дифференцируются во вспомогательные (эндоциты), которые после апоптоза фагоцитируются растушим ооцитом [81, 82]. На ранних этапах оогенеза, ещё в процессе формирования кластеров интерстициальных клеток, увеличивается экспрессия киназы GSK-3β, негативного регулятора пути Wnt, которая снижается к моменту установления ооцита. В то же время в процессе сперматогенеза увеличение экспрессии GSK-3β было зафиксировано лишь на поздней стадии в базальной части сперматогония [83]. Функциональные исследования показали, что GSK-3β необходима для инициации апоптоза в эндоцитах в процессе оогенеза [83]. Кроме того, в ооците была показана экспрессия генов *Frizzled*, β catenin и Tcf, но не Wnt [79]. Сигнальный каскад Notch также играет важную роль в оогенезе у *Hydra*: нарушение пути передачи сигнала приводит к ингибированию дифференциации интерстициальных клеток-предшественников ооцита, что приводит к образованию обширных клеточных кластеров [84]. Определены гены-мишени пути Notch в эндоцитах *Hydra* [54]. Путь клеточной трансдукции TGF-β/Smad также может быть задействован в оогенезе, но не в сперматогенезе *Hvdra*: высокая экспрессия ортолога Smad1 была детектирована у предшественников ооцита, а также на разных стадиях оогенеза, включая агрегацию и фагоцитоз [85]. Новая рецепторная тирозинкиназа Lemon была открыта у *Hydra* в процессе изучения гаметогенеза, что может свидетельствовать о включении пути RTK: увеличение экспрессии наблюдалось в агрегированных интерстициальных клетках до формирования мужской и женской гамет [86].

У Medusozoa гаметогенез происходит в гонозооидах — прикреплённых полипах с мужскими и женскими выростами-гонофорами или же в гонадах у плавающих медуз [80]. У гидроидных медуз каскад Wnt задействован в формировании полярности ооцита — анимально-вегетативной оси: экспрессия *Frizzled1* локализуется в зоне анимального полюса около ядра ооцита в процессе роста. Во время созревания ооцита *Frizzled3* аккумулируется в зоне кортекса на вегетативном полюсе, *Wnt3* – в зоне анимального полюса [87]. Функциональные исследования демонстрируют изменения полярности ооцита при нарушении пути передачи сигнала Wnt (подробно описано в обзоре Houliston et al. [88]). У *Hydractinia symbiolongicarpus* оогенез начинается в герминальной зоне тела гонозооида и продолжается в гонофоре. Сперматогенез полностью проходит в мужском гонофоре. В процессе гаметогенеза включается путь Hedgehog, гомологи лигандов которого экспрессируются в гастродермисе мужских и женских гонофоров [89]. Кроме того, может быть задействован сигнальный каскад TGF-*β* через BMP: экспрессия предполагаемого рецептора BMP (Втр. 54452) и белка Сарісиа (репрессора таргетных генов пути) была детектирована в развивающихся ооцитах женских гонофоров и гастродермисе мужских гонофоров [89].

Гаметогенез Anthozoa происходит в энтодерме мезентериев. В процессе роста и созревания ооциты постепенно выпячиваются в мезоглею, сохраняя контакт с гастродермой через трофонему, сформированную специализированными соматическими клетками гастродермы, трофоцитами. Мужские половые клетки в процессе сперматогенеза агрегируются с образованием фолликула, окружённого слоем мезоглеи. В дальнейшем половые продукты попадают в гастральную полость через разрывы эпителия мезентериев и выводятся наружу через рот [90, 91]. Wnt-каскад регулирует образование и поддержание анимально-вегетативной оси ооцита за счёт аккумуляции белка Dishevelled на анимальном полюсе и возможной деградации на вегетативном [57]. Молекулярный путь Hedgehog необходим для формирования кластеров первичных половых клеток у N. vectensis, которые локализуются в мезентериях в зоне между экспрессией лиганда Hedgehog1 и доменами рецептора Patched [72]. В результате световой индукции высвобождения ооцитов у N. vectensis была охарактеризована целая сеть молекулярных каскадов, по данным транскриптомов, включающая увеличение экспрессии компонентов пути Wnt и RTK [92]. У склерактиниевого коралла Euphyllia ancora была обнаружена активная экспрессия гомолога Notch – сигнального Notch-каскада, опосредующего межклеточные взаимодействия в незрелых и зрелых ооцитах [93].

Регуляция нейрогенеза. Сенсорные клетки эктодермы с апикальной ресничкой, ганглиозные клетки базальной части эктодермы и нематоциты (книдоциты) составляют массив нервных клеток Стрекающих. У Нуdгогоа нейрогенез начинается в интерстициальных стволовых клетках эктодермы, как у *Hydra*, или в энтодерме (гидроидные медузы) с миграцией в эктодерму. У Hydra клетки-предшественники нейронов и нематоцитов мигрируют к одному из полюсов тела (оральному или аборальному) и затем дифференцируются в разные типы клеток в зависимости от положения вдоль главной оси тела. При этом существуют вариации клеточного нейрогенеза у *Hydra* и других гидроидных [94]. У N. vectensis нейрогенез начинается с нейральных клеток-предшественников в бластуле. Дифференциация клеток происходит в клетках эктодермы во время гаструляции, а затем в энтодерме [95, 96]. У сцифоидных медуз дифференцирующиеся нервные клетки обнаруживаются в эктодерме на стадии планулы [97]. Обе группы гидроидных и сцифоидных медуз проходят этап метаморфоза в жизненном цикле, при котором происходит дегенерация части зародышевых нейронов и новый этап дифференциации и миграции нервных клеток [9]. Нейрогенез у взрослых медуз протекает в манубриуме и бульбусах шупалец [98]. Молекулярная регуляция нейрогенеза Стрекающих консервативна и включает работу упомянутых выше сигнальных каскадов (Wnt, Notch, TGF-β, FGF, Hedgehog) [94]. Подробная характеристика компонентов молекулярных каскадов описана в обзорах Galliot и Quiquand [9], Rentzsch et al. [94] и Galliot et al. [98], по данным которых и по последним научным исследованиям можно выделить ряд закономерностей молекулярной регуляции нейрогенеза у Стрекающих.

• Каскад Notch регулирует дифференцировку предшественников нематоцитов в зрелые нематоциты у *Hydra* [54, 84] и др. Hydrozoa (*Hydractinia echinata* [99]), количество эпителиальных предшественников нервных клеток и книдогенез у Anthozoa (*N. vectensis*).

• Экспрессия компонентов пути Hedgehog наблюдается у *N. vectensis* в клетках предполагаемых нервных предшественников [62], у *A. aurita* (Scyphozoa) — в ропалиях развивающейся эфиры [100].

• Молекулярный каскад Wnt/β-catenin участвует в формирования паттерна нервной системы у *N. vectensis* в апикальной части (так называемой оральной нервной сети): путь регулирует экспрессию нейрогенных транскрипционных факторов на стадии бластулы и необходим для определения клеточной судьбы нейральных предшественников нервных клеток в апикальной части тела [101]. У гидроидной медузы *H. echinata* путь передачи сигнала Wnt может включаться в процессе дифференцировки нейронов и нематоцитов [102].

• Сигнальный путь RTK через FGF задействован в развитии сенсорного апикального ресничного органа у планулы *N. vectensis* [103, 104] а молекулярный каскад МАРК, опосредующий путь RTK, стимулирует нейрогенез за счёт регуляции экспрессии нейрогенных факторов транскрипции [105]. Пути передачи сигналов VEGF и FGF, проходящие через МАРК, регулируются каскадом Wnt/β-catenin и могут участвовать в развитии нервной системы у *Hydra*, однако необходимы более подробные функциональные исследования [106].

• Эффекторы сигнального пути TGF-β/Smad – белки Smad – задействованы у *Hydra* в процессах дифференцировки нематоцитов. У *N. vectensis* TGF-β-каскад через BMP, индуцирующийся путём Wnt/β-catenin, необходим для поддержания паттерна сети нейронов в зоне рта вдоль орально-аборальной и направляющей осей [101].

Регуляция процессов регенерации и морфологических особенностей строения Стрекающих. Стрекающие обладают широким регенеративным потенциалом, в связи с чем их активно используют в качестве моделей для изучения регенерации животных. Механизмы регенерации и их молекулярная структура подробно описаны в различных обзорах [107–109]. В данном подразделе будет обобщена информация по молекулярной регуляции с помощью сигнальных каскадов (Wnt, Notch, Hedgehog, RTK, TGF-β) процессов регенерации и роста организменных особенностей строения тела Стрекающих.

Путь передачи сигнала Wnt является самым консервативным и распространённым каскадом, опосредующим регенеративные процессы Стрекающих. У *Hydra* путь Wnt включается в разных моделях регенерации:

• при установлении главной оси тела в процессе регенерации тканей в экспериментах с трансплантацией разных частей тела полипа [53];

• при регенерации участка оральной области тела путём активации Wnt3 в интерстициальных клетках участка регенерации [110] и последующей активации пула лигандов Wnt [50] с формированием петли обратной связи [50];

• роль β-catenin в регенерации головной части полипа также была продемонстрирована в экспериментах с ингибированием и оверэкспрессией β-catenin [111];

• при регенерации тканей подошвы, что было показано в экспериментах с ингибированием и оверэкспрессией β-catenin [111];

• при регенерации частей тела *de novo* в клеточных агрегатах – организатора головной части за счёт Wnt3 [47, 112], в том числе в малых кластерах клеток [113], при механическом растяжении ткани *Hydra* в сфероидах из клеток, где Wnt3 активируется в процессе регенерации головной части за счёт зависимой от растяжения транскрипционной активации его гена [114].

Помимо регенеративных процессов, у *Hydra* сигнальный каскад Wnt/PCP при активации канонического пути задействован в процессах дифференциации эпителиальных стволовых клеток в зоне образования щупалец и почек [49]. Кроме пути передачи сигнала Wnt, у Hydra в процессах регенерации включаются и другие молекулярные пути. Сигнальный каскад МАРК, активирующийся при заживлении раны, модулирует Wnt при рассечении Hydra пополам с возможным механизмом транскрипционной активации лигандов Wnt, необходимых для формирования регенеративного процесса [115], а также активирует процесс апоптоза, необходимого для регенерации головной части *Hydra* [116]. Путь Notch необходим для восстановления центра организации головной части в процессе регенерации и модуляции паттерна закладки шупалец [117], а передача сигналов через VEGF и FGF играет важную роль в регенерации гипостома и щупалец [106]. Каскад ВМР, регулируемый канонический путём Wnt, задействован в базальной регенерации тела *Hydra* [118]. Путь Hedgehog может участвовать в регенерации апикальной и базальной частей тела *Hydra* при рассечении: ортолог лиганда Hedgehog дифференциально экспрессировался в эндодермальных клетках гипостома и базальной части тела *Hydra*, в зоне подошвы в интактных животных и при рассечении тела поперек – в экто- и энтодерме апикальной и базальной зон с усилением экспрессии в верхней части тела [119].

Регенеративные процессы представителей Medusozoa также связаны с включением каскада Wnt. У гидроидной медузы *Hydractinia* каскад функционально задействован в регенерации апикальной части полипа с образованием бластемы и одновременным ингибированием роста столона [67]. Регенерация столона требует, в свою очередь, ингибирования каскада Wnt [120]. У гидроидной медузы Clytia путь Wnt активируется в процессе ремоделирования тканей купола медузы, установления бластемы и регенерации манубриума [121]. Каскад Wnt в том числе опосредует морфологические особенности строения отдельных Medusozoa. Так, у колониальных гидроидов сигнальный каскад Wnt задействован в регуляции структуры колоний, связанной с положением зачатков полипов в колонии, специфической для столонов экспрессией отдельных компонентов каскада в пределах одной колонии, что подробно описано в обзоре Cartwright et al. [122], и с морфогенезом ветвления колоний [123]. Помимо Wnt, в разных по морфологии и функциям полипах единой колонии экспрессируются лиганд каскада Hedgehog (гомолог *Hedgehog*) — в гастродермисе мужских и женских гонофоров, рецептор ВМР (*BmpR* 54452) – в ооцитах и гастродермисе мужских гонофорах, что может быть связано с гаметогенезом [89]. В пределах одного организма *Hydractinia* путь Wnt peгулирует количество и положение щупалец на полипе [124]. Морфогенез шупалец у *Hydractinia* в процессе регенерации апикальной части тела и в процессе метаморфоза планулы опосредуется сигнальным каскадом Notch [99]. Ветвление щупалец Cladonema pacificum, связанное с агрегацией интерстициальных клеток в области формирования ветви, регулируемой каскадом МАРК, опосредуется молекулярным путём RTK, задействованным в удлинении ветвей [125].

Подробное описание механизмов регуляции регенерации и функциональное значение каждого каскада у представителей Anthozoa описано в обзоре Röttinger [108]. Здесь следует выделить важные моменты. Путь передачи сигнала Notch и каскад MAPK у N. vectensis включаются в процессе регенерации глотки полипа при её ампутации, при этом после нанесения раневого повреждения проколом эпителия в заживлении раны также участвует МАРК, что сопровождается активацией апоптоза в области повреждения [126]. Каскад Wnt регулирует определение, формирование и поддержание ротового паттерна полипа [58]. Путь FGF, по данным экспрессии, активируется через 20 часов при регенерации отсечённого от ротового отверстия до подошвы куска тела у актинии Calliactis polypus, что может свидетельствовать о начале нейрогенеза, по аналогии с экспрессией компонентов FGF при нейрогенезе у планулы N. vectensis [103, 127]. При регенерации полипов колониальных склерактиниевых кораллов из недифференцированных кусочков ткани включаются каскады Wnt и FGF по данным экспрессии разных компонентов каждого пути на разных этапах регенеративного процесса, что свидетельствует о возможном перекрёстном взаимодействии двух каскадов. При этом у данных кораллов сохранялась тенденция регенерации головной части, подобно Hydra при поперечном иссечении и N. vectensis при повреждении, а также активация апоптотических процессов с последующей активацией канонического пути Wnt [128]. С подробным описанием механизмов молекулярной регуляции регенерации у немодельных представителей Anthozoa можно ознакомиться в обзоре van der Burg и Prentis [129].

Регуляция жизненного цикла Стрекающих. Стрекающие демонстрируют большое разнообразие жизненных циклов, включающее подвижные и прикреплённые стадии, наличие вегетативного и полового процессов с вариациями пола (гонохоризм, гермафродитизм) [80]. Ансамбль молекулярных каскадов участвует в регуляции перехода из стадии в стадию.

У *Hydra* вегетативное размножение происходит за счёт процесса почкования: эвагинация почки из стенки тела, сопровождающаяся пролиферацией и тканевыми перестройками в соответствии орально-аборальной оси нового организма, приводит к образованию дочернего полипа, который впоследствии отделяется и становится автономным. Сигнальные каскады FGFR и Notch функционально задействованы в формировании границы между родительским полипом и дочерним зачатком почки с возможным включением пути Wnt (экспрессия *Tcf* и β catenin показана в зоне начала эвагинации почки), что подробно описано в обзоре Böttger и Hassel [130]. Размеры тела *Hydra* контролируются как Wnt-, так и TGF-β-каскадами, притом Wnt-путь непосредственно влияет на экспрессию компонентов TGF-β-пути. TGF-β сигнальный путь контролирует, в свою очередь, образование почки при вегетативном размножении, что формирует определённый переключатель развития между фазой роста и репродуктивной фазой, определяющий количество клеток организма *Hydra* [131].

У представителей класса Hydrozoa группы Medusozoa отдельные молекулярные каскады задействованы в процессах развития половой (медуза) и бесполой (полип) стадий жизненного цикла. Медуза развивается из группы пролиферирующих клеток, называемой энтокодоном, который образуется путём инвагинации участка эктодермы к энтодерме с формированием полости [132]. Полип развивается из планулы путём метаморфоза или морфологической перестройки, сопровождающейся апоптозом и редифференциацией отдельных типов клеток [133, 134]. В процессе метаморфоза планулы включается каскад Wnt. У Clytia и Hydractinia в зоне орального полюса эктодермы планулы экспрессируется Wnt3, при этом у Hydractinia такая экспрессия связана с предотвращением апоптоза [135], что, предположительно, может быть и у *Clytia* [136]. Кроме того, у *Hydractinia* в процессе метаморфоза путь Wnt/Tcf опосредует формирование и поддержание орального паттерна с редукцией развития столонов при эктопической активации сигнального каскада [67]. Путь Notch не задействован функционально в формировании нервной системы Hydractinia в

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

процессе метаморфоза [99]. Лиганд VEGF, путь передачи которого опосредуется RTK-каскадом, но не рецептор пути VEGFR, активно экспрессируется в процессе метаморфоза планулы в клетках энтодермы *Podocoryne carnea*. Также лиганд и рецептор экспрессируются в энтодерме развивающейся медузы *P. carnea* на стадии почки — выроста тела полипа, затем в развивающихся радиальных каналах, клетках поперечнополосатых мышц и бульбусах щупалец. При этом экспрессия VEGFR в этих областях медузы низкая [137].

На примере *P. carnea* была показана активация дифференциальной экспрессии генов канонического пути Wnt на стадии репродуктивного полипа (Wnt, Frizzled, LRP5/6, Dishevelled, *CK2*, *APC*, *Tcf/Lef*), что может быть связано с дальнейшим развитием медуз на гонофорах [138]. Также была детектирована коэкспрессия генов лиганда Wnt3 и мембранных рецепторов Frizzled (1 u 3) на дистальном и оральном концах осей последовательного развития медуз и полипов [138], что демонстрирует универсальную роль сигнального каскада Wnt в процессе развития разных стадий жизненного цикла. У представителя Стрекающих с отсутствующей стадией личинки-планулы в жизненном цикле (Aplanulata) Ectopleura larynx Wnt-путь опосредует развитие как полипов, так и ранних мужских и женских гонофоров, представляющих собой недоразвитых медуз, прикреплённых к полипам. При этом экспрессия компонентов Wnt-пути коррелирует с половым диморфизмом гонофоров Е. larynx, связанным с образованием зачатков щупалец в оральной зоне женского гонофора и шарообразной структуры, не разделённой на щупальца, в оральной зоне мужского гонофора [139]. Кроме того, авторы исследования предполагают, что ингибирование экспрессии элементов пути Wnt может быть вовлечено в процессы нарушения полноценного развития медузы *E. larynx* [139].

У сцифоидных медузы развиваются из апикальной части полипа в процессе стробиляции (сегментации), а полип, в свою очередь, – из планулы в результате метаморфоза, связанного с элиминацией энтодермы планулы и образованием вторичной энтодермы из клеток эктодермы планулы с последующим развитием щупалец полипа [140]. У Aurelia дифференциальная экспрессия разных компонентов каскада Wnt, специфическая главным образом для стадии личинки-планулы, и несколько лигандов со специфической экспрессией для медузы и стробилы были детектированы на разных стадиях жизненного цикла [35]. В процессе стробиляции Aurelia включается несколько молекулярных каскадов. Wnt11a экспрессируются в эктодерме оральной части каждого развивающегося сегмента — будущей эфиры, что сопровождается экспрессией Bmp5/8 в энтодерме развивающейся гастральной полости [33]. Гиперактивация пути Wnt приводит к нарушению стробиляции, связанной с отсутствием границ между сегментами [33]. Компоненты сигнального пути Hedgehog экспрессируются на стадии стробилы в сегментах и развивающейся эфиры (рецептор Patched и лиганды SHH1, SHH2) Aurelia. Ингибирование этого каскада приводит к нарушению процесса сегментации полипа в процессе стробиляции [100].

У N. vectensis в результате метаморфоза планулы теряется подвижность с оседанием на дно, формируется ротовое отверстие, окружённое зачатками щупалец, и развиваются первые мезентерии [96]. Несколько генов-лигандов каскада TGF-β (Bmp2/4 и Gdf5-like) начинают экспрессироваться на стадии бластулы и далее в мезентериях N. vectensis в процессе метаморфоза [40, 61, 63, 141]. Сигнальный путь FGF играет важную роль в процессе состояния компетентности, то есть способности планулы задерживать метаморфоз до обнаружения определённых сигналов среды обитания, и метаморфоза планулы рифового коралла Acropora millepora, что было показано с помощью ингибироваия рецептора пути FGFR1 в личинках в состоянии компетенции [142].

Данных по изучению молекулярных каскадов, задействованных в процессах развития у представителей Cubozoa, почти нет. Известно, что в геноме *Morbakka virulenta* было найдено 14 генов семейства *Wnt* [33], однако отсутствует информация по функциональной составляющей Wnt-пути.

Процессы развития Cnidaria опосредуются теми же ключевыми молекулярными путями, что и у высших Metazoa: Wnt, Hedgehog, Notch, TGF-β и RTK. Функциональная составляющая каждого сигнального каскада индивидуальна для отдельных классов Cnidaria, однако можно выделить закономерности включения определённых сигнальных путей, определяющих одни и те же процессы развития у представителей Стрекающих разных классов. Так, Wnt-путь опосредует формирование орально-аборальной оси у всех Cidaria, а путь Notch задействован в книдогенезе у Hydra, Nematostella и Hydractinia. Помимо описанных выше классических сигнальных путей, в процессах развития Cnidaria задействовано большое разнообразие молекулярных каскадов, специфичных именно для Стрекающих. Данные сигнальные пути более подробно описаны в литературе [92, 100, 143].

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ РАЗВИТИЯ СТРЕКАЮЩИХ

Использование новейших молекулярно-генетических методов, применяемых для изучения процессов развития, позволяет проводить детальные исследования не только молекулярной структуры и локализации включения регуляционных сигнальных каскадов в пределах организма, но и их функциональной значимости в отдельных процессах онтогенеза. Изучение функций путей клеточной трансдукции, рассмотренных в предыдущем разделе, осуществляется с помощью спектра методов, связанных с генной манипуляцией, к которым в настоящий момент относятся фармакологические методы модулирования активности молекулярных каскадов и методы обратной генетики (RNAi-, морфолино-опосредованный нокдаун, CRISPR/Cas9, TALEN/Fok1-опосредованный нокаут, гиперэкспрессия мРНК, использование индуцибельных промоторов, активируемых тепловым шоком). Подробное описание методик изучения процессов развития на известных моделях Стрекающих рассмотрено в обзорах [22, 96, 108]. В данном разделе будут рассмотрены последние данные по использованию методов широкомасштабного секвенирования при изучении процессов развития Стрекающих.

Применение методов широкомасштабного секвенирования геномов для изучения механизмов развития и распространения Стрекающих. Технологии полногеномного секвенирования активно используются для изучения разнообразных аспектов развития и распространения Cnidaria [30, 31, 33, 34, 37, 144, 145]. Последние исследования геномов Стрекающих выявляют интересные особенности этого типа в плане развития и адаптации к условиям окружающей среды. Так, учёные определили геномные характеристики коралловых полипов Acropora (Anthozoa) и генетические детерминанты их приспособленности к изменению условий окружающей среды [146]. Молекулярное датирование позволило определить эволюционную историю развития Acropora, выявив, что их предки возникли около 55,8 млн лет назад и пережили поэтапное повышение и понижение глобальной температуры. Возможно, это привело к увеличению видового разнообразия Acropora [146]. Кроме того, была установлена предполагаемая причина высокой чувствительности кораллов Acropora, приводящая к обесцвечиванию, связанная с нарушением у них синтеза цистеина, ведущего к зависимости от симбиотических водорослей. Также, по геномным данным, были определены основные механизмы адапта-

ции кораллов к стрессовым условиям окружающей среды, унаследованные от далеких предков Acropora. Это специфичный механизм высокоскоростной кальцификации кораллов, специфическая тандемная дупликация генов ответа на стресс (например гены, кодирующие малые цистеин-богатые пептиды и коралловые каспазы), увеличение количества генов диметилсульфопропионат лиазы (фермента цикла серы в океане, который опосредует обратную связь между атмосферой и океаном и может влиять на регулирование местного климата), произошедшее ещё у предков Acropora в результате горизонтального переноса генов от симбиотических водорослей, и положительный отбор генов, кодирующих антимикробные пептиды, и генов симбиоза [146]. Секвенирование генома гигантской медузы Nemopilema nomurai (Scyphozoa) выявило индивидуальные генетические особенности этого вида, связанные с мобильностью и активным хищничеством, которые опосредуются увеличением числа генов, кодирующих миозины II типа, нейротрансмиттеры и белки ядов [34].

Применение широкомасштабного секвенирования для исследования процессов прямого и обратного развития Стрекающих. Молекулярно-генетические детерминанты особенностей жизненного цикла существенно важны для исследования процессов развития Стрекающих. Как было описано ранее, некоторые представители Medusozoa обладают возможностью направлять своё развитие в обратную сторону (по сравнению с типичным жизненным циклом) с переходом на более раннюю стадию развития. Описание этапов классического пути жизненного цикла и переключение на «обратное развитие» на уровне клеточных процессов представляет особый научный интерес в области биологии развития.

Больше всего молекулярно-генетических исследований проводится в отношении прямого развития Cnidaria. Так, у Scyphozoa на примере *А. aurita* был охарактеризован процесс перехода от стадии полипа к медузе и проведён анализ регуляции жизненного цикла. Исследователи разделили процесс перехода на 3 этапа: индукция метаморфоза понижением температуры, стробиляция (сегментирование тела полипа с апикальной части и по направлению к проксимальной) и развитие новых медуз из отделившихся в процессе стробиляции сегментов-эфир [147]. Было установлено, что в процессе стробиляции происходит выработка молекулярных веществиндукторов метаморфоза, которые концентрируются в сегментированной части стробилы и отсутствуют у полипов и эфир. По данным транскриптомного секвенирования стадий полипа, медузы и эфиры, исследователи определили,

через 48 часов инкубации) – и гормон естественной стробиляции, специфичный для A. aurita [147]. С помощью транскриптомного профилирования полного жизненного цикла A. aurita были более подробно охарактеризованы основные сигнальные каскады, опосредующие специфические для разных стадий процессы [35, 100], и специфические для каждого этапа жизненного цикла транскрипционные факторы [35], что было также продемонстрировано на представителе Scyphozoa Rhopilema esculentum [148]. На стадии планулы у аурелии экспрессировались основные компоненты пути Wnt (Wnt2, -3, -5b, -8 и -16a), Frizzled, GSK-3β и Axin. В то же время на других стадиях экспрессировалась лишь часть лигандов: Wnt9/10, Wnt11a и Wnt3 – на стадии медузы, Wnt16b – на стадии стробилы [35]. Подобная дифференциальная экспрессия демонстрирует активное включение каскада Wnt в раннем эмбриональном развитии аурелии. В исследовании развития Hydrozoa, проведённом Leclère et al. [144], была охарактеризована молекулярная структура жизненного цикла Clytia hemisphaerica с определением специфических маркёрных генов и транскрипционных факторов для каждой стадии, а также проведён сравнительный анализ процессов развития у Hydrozoa, Scyphozoa и Anthozoa. Сборка транскриптома de novo и последующий биоинформатический анализ позволили сформировать новую высококачественную базу транскриптомных данных представителя Cubozoa Tripedalia cvstophora, которая была использована для идентификации специфических для Стрекающих нейропептидов, что расширило современные представления о нейроанатомии представителей Cubozoa [149]. Молекулярные пути и механизмы, лежащие в основе полового размножения, были подробно описаны с использованием транскриптомных данных у представителя Anthozoa N. vectensis [92]. Авторы определили ключевые процессы, активирующиеся при высвобождении ооцитов в результате световой и тепловой индукции, к которым относятся световосприятие (экспрессия фоторецепторов), организация внеклеточного матрикса, регуляция актинового цитоскелета и компоненты циркадных ритмов. При этом экспрессия компонентов метаболических путей, таких как липидный метаболизм, и компонентов клеточного цикла была подавлена. Половое размножение у исследуемых актиний более чувствительно к температур-

что процесс стробиляции инициирует сигналь-

ный путь ретиноевой кислоты, запускающийся

при добавлении ретинола в среду. Также были

определены индуктор стробиляции — 5-меток-

си-2-метилиндол (индуцировал стробиляцию

ным сдвигам, чем к световым изменениям [92]. Таким образом, высокопроизводительное секвенирование транскриптомов Стрекающих позволяет подробно описать молекулярно-генетическую структуру развития, а также определить механизмы развития и влияние условий окружающей среды на жизненный цикл.

Эпигенетические подходы к изучению развития Стрекающих. Применение методов высокопроизводительного секвенирования для изучения процессов развития Стрекающих позволяет проводить более детальные исследования, касающиеся структуры генома и генной экспрессии с функциональной аннотацией. Помимо активно использующихся методов секвенирования тотальных геномов и транскриптомов, нужно выделить эпигенетические исследования, используемые для изучения генетических модификаций, не связанных с изменениями в первичной последовательности ДНК, и применение технологии секвенирования геномов, транскриптомов и эпигеномов единичных клеток в исследуемом образце для структурного и функционального описания различных типов клеток одного организма.

Эпигенетические изменения являются вариантом реакции генома живого организма на вариабельные условия окружающей среды [150]. В настоящее время изучение эпигенетических модификаций ограничено доступными методами, такими как анализ ДНК-метилирования, исследования открытых участков хроматина, ДНК-белковых взаимодействий и различных модификаций гистонов.

Механизм ДНК-метилирования, заключающийся в переносе метильной группы в положение С5 на цитозине с образованием 5-метилцитозина, регулирует экспрессию генов путём привлечения белков-репрессоров или путём ингибирования связывания транскрипционных факторов с ДНК [151]. Существует несколько вариантов метилирования в зависимости от положения цитозина, которые можно разделить на 2 группы. К первой группе относится самый распространённый вариант метилирования, возникающий на цитозинах, предшествующих гуаниновым нуклеотидам (CpG-сайты) [151]. Ко второй группе относятся редко встречающиеся варианты метилирования не по CpG-сайтам, а на цитозинах, предшествующих другим типам нуклеотидов (А, Т, С), что было детектировано у растений [152]. В геномах беспозвоночных метилирование ДНК относительно редко встречается в нуклеотидном контексте CG, однако оно часто детектируется в активно транскрибируемых генах [153]. В процессе развития живого организма уровень метилирования ДНК в геноме постоянно меняется, что является важной характеристикой для изучения регуляторных функций генома [151]. Одним из полногеномных методов изучения метилирования ДНК является бисульфитное секвенирование, объединяющее разные подходы к изучению метилирования, большая часть из которых основана на бисульфитной конверсии ДНК для обнаружения неметилированных цитозинов (рис. 2). В процессе подготовки библиотеки инкубация с бисульфитом приводит к химической конверсии всех неметилированных цитозинов на урацил, который в процессе секвенирования идентифицируется как тимин. При последующей обработке высчитывают процент метилированных цитозинов по данным прочтений после секвенирования [154, 155].

Данных по исследованию ДНК-метилирования у Стрекающих не так много, однако они демонстрируют важную роль метилирования в процессах регуляции развития. На примере симбиотического модельного организма Aiptasia (Anthozoa) было показано существование генов с повышенным уровнем метилирования ДНК по СрG-сайтам в кодирующей области гена и понижением уровня метилирования ДНК в областях начала и конца транскрипции [157]. Исследователи предполагают, что такое специфическое метилирование играет важную роль для повышения точности транскрипции у Aiptasia и поддержания транскрипционного гомеостаза, отвечающего за симбиоз [157]. В то же время нанопоровое секвенирование полногеномного профиля ДНК-метилирования у симбиотического коралла Anthopleura elegantissima (Anthozoa), который может существовать и как апосимбионт, продемонстрировало схожие профили метилирования у симбиотической водоросли Elliptochloris marina и у апосимбиотического A. elegantissima, что может быть обусловлено особенностями симбиоза конкретных организмов [158]. У разных представителей Anthozoa CpG-метилирование в кодирующей области генов связано с пластичностью генной экспрессии в разных средах и популяциях [159], а также с акклиматизацией [160], адаптацией к низким уровням рН [160] и эволюцией кодонов [161]. Данные по метилированию ДНК у *Hydra* ещё нуждаются в функциональной оценке, однако есть некоторые исследования по тотальному уровню метилирования ДНК в целом организме. В геноме *Hydra* показано низкое содержание GC [162], поэтому уровень метилирования в СрG-сайтах значительно ниже, чем в других областях генома. Авторы данного обзора предполагают, что метилирование аденозина в положении N6 (m⁶dA) может способствовать началу транскрипции, необходимой в непрерывно делящихся и дифференцирующихся клетках тела *Hydra*, а



Рис. 2. Принцип полногеномного бисульфитного секвенирования. Обработка образца ДНК бисульфитом приводит к химическому преобразованию неметилированных цитозинов в урацилы, которые при проведении амплификации определяются как тиминовые основания. Бисульфит-конвертированная ДНК используется для подготовки библиотеки секвенирования, которая заключается в лигировании адаптеров, сиквенсных праймеров и амплификации библиотеки. По полученным данным секвенирования проводится анализ сайтов гипер- и гипометилирования по всему геному. Схема – на основе протокола бисульфитной конверсии набора EZ DNA Methylation-Gold™ Kit («Zymo Research», США). Описание к рисунку составлено на основе источников [154, 156]

метилирование цитозина в положении C5 может динамически регулироваться в процессе дифференцировки ооцитов [163]. У представителей эндопаразитов группы Мухо-sporea (Мухогоа), по данным бисульфитного секвенирования, полностью отсутствует метилирование ДНК по цитозину, что, по мнению авторов, может быть связано с малым размером генома [164]. Следующим важным методом эпигенетических исследований является изучение доступности хроматина в геноме по непосредственной детекции открытых областей, чувствительных к нуклеазам, а также областей, в которых наблюдается низкая плотность нуклеосом или же они отсутствуют. Открытый хроматин называют ещё «активным» по способности к экспрессии ге-



Секвенирование Рис. 3. Принцип метода ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing). Гиперактивная транспозаза Tn5 инкорпорирует специфические адаптеры в области открытого хроматина в месте разреза ДНК. Очищенная фрагментированная по открытым участкам ДНК используется для подготовки библиотеки секвенирования. По полученным данным секвенирования проводят анализ открытых участков генома, детектируют положение нуклеосом и закономерности расположения транскрипционных факторов [165]

нов. Одним из часто используемых эпигенетических подходов является анализ доступного для транспозазы хроматина с помощью секвенирования или ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) [165]. Принцип метода заключается в использовании высокоактивного фермента транспозазы Tn5, которая фрагментирует ДНК по открытым участкам, одновременно интегрируя праймеры для секвенирования (рис. 3) [165].

Секвенирование библиотеки проводится на стандартных платформах, например, на платформе «Illumina», США. Анализ данных позволяет идентифицировать открытые участки хроматина в геноме, а также использовать эти данные для изучения регуляции экспрессии генов. Исследования с использованием ATAC-seq на N. vectensis продемонстрировали взаимосвязь открытых участков хроматина и транскрипции генов циркадного ритма, изменяющейся в зависимости от режима светового культивирования. По результатам исследования показано, что более половины промоторов известных циркадных генов находились в участках открытого хроматина. Кроме того, в работе были идентифицированы активные энхансеры, специфичные для разных режимов светового культивирования [166]. Эксперименты с тепловым воздействием (37 °C) на N. vectensis, выращенную в лабораторных условиях и собранную в полевых условиях, показали, что разные условия выращивания влияют на эпигеном N. vectensis, демонстрируя участие

различных транскрипционных факторов и отличный для разных условий транскрипционный ответ на повышение температуры. Функциональный анализ состава дифференциально экспрессируемых генов позволил определить, что в ответ на тепловое воздействие включаются разные сигнальные клеточные пути, зависящие от условий культивирования: в полевых условиях - пути, относящиеся к контрольным точкам клеточного цикла, репликации, репарации ДНК и структурированию гомеостаза, а в лабораторных условиях – пути, связанные с метаболическими процессами (метаболизмом аминокислот, амидов), везикулярным транспортом и стабилизацией белков. Таким образом, данное исследование демонстрирует прямое воздействие условий окружающей среды на эпигенетическую регуляцию ответа на стрессовые условия [167]. Разная эпигеномная регуляция в ответ на тепловой стресс была показана у вышеупомянутого симбиотического анемона *Aiptasia* [168]. Описана эпигенетическая регуляция в процессе регенерации оральной части с щупальцами у *Hydra*. По данным ATAC-seq, у *Hydra* в верхней части тела на стадии регенерации идентифицировали более 20 000 открытых хроматиновых участков. В сопоставлении с другим эпигенетическим методом ChIP-seq (описанным ниже) удалось установить положение доступных участков хроматина: более 3000 из них находились в межгенных областях, более 800 открытых регионов перекрывались с интронами и более 200 участков – с экзонами. Таким образом, впервые был представлен анализ элементов открытого хроматина в геноме Стрекающих в контексте процесса развития [169].

Анализ ДНК-белковых взаимодействий является важнейшим из эпигенетических методов, позволяющим довольно точно детектировать регуляторные элементы генома. Одним из распространённых методов считается ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing) или иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием [170]. Принцип заключается в использовании специфических антител, которые при инкубации иммунопреципитируют ДНК-связанные белки, затем ДНК осаждается, очищается от белков и секвенируется (рис. 4). Этот метод позволяет детектировать области активных промоторов, сайты связывания транскрипционных факторов и других регуляторных элементов по всему геному, а также в сочетании с РНК-секвенированием и ДНК-метилированием устанавливать регуляторные сети генов [170, 171].

Кроме того, данный метод используется для анализа модификаций гистонов, определяющих

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

состояние транскрипции генов локального участка генома. К основным хорошо известным типам модификаций относятся: ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и убиквитинирование. Существуют также и другие недавно открытые типы модификаций, например, деиминация или пролиновая изомеризация [174]. В настоящее время известно большое количество данных по модификациям гистонов и их функциям в хроматине [175], однако к основным гистоновым меткам, широко использующимся в эпигенетических исследованиях, относятся: монометилирование по четвёртому остатку лизина гистона H3 (H3K4me1) и ацетилирование гистона НЗ по лизину 27 (НЗК27ас), связанные с энхансерными областями; метка промоторных регионов – триметилирование гистона Н3 по четвёртому остатку лизина (H3K4me3); триметилирование гистона H3 по лизину 36 (H3K36me3) – метка транскрибируемых участков в теле генов; триметилирование гистона НЗ по лизину 27 (H3K27me3) — метка транскрипционного репрессорного комплекса Polycomb; триметилирование гистона Н3 по лизину 9 (Н3К9те3) – метка гетерохроматина [173].

Данные ChIP-seq расширили понимание эпигеномной регуляции регенерации частей тела Hydra. Как было упомянуто выше, комбинирование с данными ATAC-seq позволило определить положение доступных участков хроматина, а также идентифицировать кандидаты активных проксимальных промоторов, энхансерных регионов и транскрипционных факторов [169]. В процессе регенерации тканей апикальной части тела *Hydra* было отмечено динамическое ремоделирование регуляторных элементов, большинство которых теряло свою доступность при регенерации. При этом определённые энхансерные и промоторные области активировались, например, один промоторный и два регуляторных сайта гена Wnt3, который, как известно, задействован в организации апикальной части *Hydra* в процессе регенерации [169]. При эктопической активации пути Wnt были детектированы межгенные участки – потенциальные энхансеры рядом с генами ключевых транскрипционных факторов (Brachyury1, Cngsc, Pitx1) и лигандов Wnt-пути (Wnt5a, Wnt11), регулирующих развитие головной части Hydra [176].

В геноме *N. vectensis* было идентифицировано более 5000 энхансерных областей, подтверждённых также в экспериментах *in vivo* [177]. Также у *N. vectensis* была определена ассоциация транскрипционного кофактора p300 с энхансерами и показана их активация непосредственно в процессе гаструляции и на стадии планулы. Функциональная характеристика генов, распо-



Рис. 4. Принцип метода ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing). Фиксация хроматина, связанная с обработкой клеток формальдегидом, *in vivo* приводит к перекрёстному сшиванию ДНК и целевых белков. При изучении нативного хроматина этот шаг опускается. Далее хроматин фрагментируется ферментативно или ультразвуковой обработкой. Последующая преципитация целевых ДНК-связывающих белков осуществляется путём использования специфичных антител к данным белкам. Очистка ДНК заключается в длительном нагреве и ферментативной обработке протеиназами и рибонуклеазами с последующей очисткой на мембранных колонках или путём фенол-хлороформной экстракции. Готовая ДНК используется для подготовки библиотеки. По полученным данным секвенирования проводят анализ открытых участков генома, положения транскрипционных факторов и сайтов модификаций гистонов [171–173]

ложенных вблизи энхансерных областей, выявила превалирование генов регуляции транскрипции, сигнальных клеточных путей и процессов развития у *N. vectensis*. При этом гены, кодирующие транскрипционные факторы, были связаны с несколькими энхансерами чаще, чем гены домашнего хозяйства [177].

Изучение развития Стрекающих на уровне единичных клеток. Методы секвенирования геномов, транскриптомов и эпигеномов отдельных клеток положили начало новой эре молекулярно-генетических исследований процессов развития живых организмов, что позволило проводить более детальные исследования разных типов клеток в пределах одного организма и изучать клеточную дифференциацию на разных этапах жизненного цикла. В данном подразделе будут описаны исследования на Стрекающих с использованием секвенирования единичных клеток.

Первым и фундаментальным научным исследованием по секвенированию отдельных клеток Стрекающих является работа научных групп Marlow и Tanay [178]. В качестве модельного объекта использовали представителя акти-

ний N. vectensis, на котором были проведены эксперименты по секвенированию транскриптомов единичных клеток (по-другому называют single cell RNA-sequencing или scRNA-seq) и открытого хроматина методом ATAC-seq. Для секвенирования транскриптомов использовали метод массивного параллельного секвенирования единичных клеток (MARS-Seq), который заключается в сортировке клеток с помощью проточного сортирующего цитофлуориметра (FACS) и их иммобилизации на луночном планшете (каждая клетка в отдельной лунке). После лизиса клетки на полиА-последовательность мРНК отжигается олиго(dT)-праймер с уникальным молекулярным олигонуклеотидным идентификатором (UMI), индивидуальным для каждого праймера и лунки, одинаковым для всех праймеров в каждой лунке клеточным баркодом, адаптером «Illumina» и промотором Т7. С олиго(dT)-праймера начинается обратная транскрипция с образованием первой цепи комплементарной ДНК (кДНК). После этого все клеточные лизаты смешиваются, образуя единую группу для дальнейшей амплификации. Синтезируется вторая цепь кДНК с последующей транскрипцией. Полученная РНК фрагментируется, и к ней лигируют адаптер «Illumina» для секвенирования с дополнительным баркодом клеточной смеси (группы амплификации). После обратной транскрипции готовая баркодированная кДНК используется для подготовки библиотеки для секвенирования (рис. 5) [179, 180].

Комбинируя транскриптомные и эпигеномные данные единичных клеток, исследователям удалось создать целый атлас различных типов клеток у взрослого организма N. vectensis: были идентифицированы кластеры разных клеток и гены со специфической для каждого кластера экспрессией, то есть маркёрные гены для каждого типа клеток. Например, было показано, что в книдоцитах экспрессируются белки капсу-(миниколлагены, нематогалектины) лы И ядов (NEP). Также исследователи охарактеризовали разные типы клеток у стадии планулы, отметив при этом два плануло-специфических кластера клеток – нейроны и клетки апикального органа. Сравнительный анализ репертуаров генов, специфичных для разных типов клеток, показал, что высоко консервативные гены имеют низкую специфичность к типу клеток, а гены, кодирующие специфичные белки Стрекающих, демонстрируют высокую тканевую специфичность. Кроме того, сравнение кластеров клеток актинии и модельной нематолы Caenorhabditis elegans выявило 3 типа клеток N. vectensis, схожих по специфической генной экспрессии с разными типами клеток у C. elegans: ретракторные мышцы и гастродермис N. vectensis соответствуют мышцам кишечника и стенки тела C. elegans; недифференцированные клетки-предшественники N. vectensis – клеткам зародышевой линии и клеткам-предшественникам у C. elegans со специфической экспрессией генов хромосомной организации, ассоциированной с митозом, репликацией и клеточной пролиферацией; нейроны N. vectensis — нейронам C. elegans. Дополнительно исследователи установили модули транскрипционных факторов, регулирующие разнообразие клеток у N. vectensis, а также тканеспецифичные регуляторные элементы в геноме N. vectensis [178]. Таким образом, данное исследование демонстрирует новые знания об эволюции типов клеток животных и тканеспецифической геномной регуляции.

Исследование на стволовых клетках *Нуdra* с применением секвенирования транскриптомов единичных клеток позволило описать разнообразные типы клеточных линий и их изменения в процессе дифференцировки [181]. Ученые применили другую технологию секвенирования, которая называется «полногеномное профилирование экспрессии отдельных клеток с использованием нанолитровых капель» или Drop-seq (Droplet-sequencing) (рис. 6) [182].

Принцип метода заключается в генерации за счёт тонкой микрофлюидики одноклеточной эмульсии, состоящей из водно-масляной капли, шариков из смолы с баркодированными праймерами и клеток исследуемого образца, таким образом, что все фрагменты от одной клетки имеют общий баркод. Полученная эмульсия используется в дальнейшем для создания стандартных библиотек с короткими фрагментами для секвенирования на распространённых приборах фирмы «Illumina». Подготовка библиотеки включает этап тагментации – фрагментации ДНК транспосомами с одновременным лигированием адаптерных последовательностей для последующей амплификации с сиквенсными праймерами «Illumina». После секвенирования специальное программное обеспечение использует идентификационные баркоды для сопоставления прочтений и их количества с их ядром или клеткой [182]. Исследователи отсеквенировали около 25 000 транскриптомов единичных клеток. По результатам анализа все клетки были разделены на 3 кластера, представляющие отдельные клеточные линии: эктодерму, эндодерму и интерстициальные клетки. В каждом кластере были определены свои популяции клеток в широком диапазоне состояний дифференцировки. Так, например кластеры дифференцированных эпителиальных клеток головы и подошвы связаны с соответствующими кластерами Приготовление клеточной суспензии. Сортировка клеток на проточном цитометре FACS с изоляцией клеток в отдельных лунках многолуночной планшеты.

Лизис клеток и отжиг на полиА-конце мРНК праймера олиго(dT) с уникальным молекулярным идентификатором (UMI), клеточным баркодом (Cell_bc), адаптером Illumina (IA1) и промотором T7. Обратная транскрипции (OT) с образованием первой цепи кДНК и последующая очистка от остатков праймеров OT.



Объединение клеточных лизатов, синтез второй цепи кДНК. Линейная амплификация путем транскрипции *in vitro* с последующим удалением остатков матрицы ДНК (обработка Dnase I).





Библиотека для секвенирования





Рис. 5. Принцип метода MARS-seq (Massively parallel single cell RNA-Seq). Особенностью метода является возможность использования трёхуровневого баркодирования: молекулярной метки (UMI), клеточной метки и метки клеточной смеси для более точного анализа количества молекул. Метод позволяет учитывать только 3'-транскрипты мРНК с индивидуальными баркодами. По полученным данным секвенирования анализируют спектр активной мРНК во множестве отдельных клеток. Описание к рисунку составлено на основе источников [179, 180]

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ СТРЕКАЮЩИХ



Подготовка клеточной суспензии. Инкапсуляция отдельных клеток в капли с микрочастицами с баркодами (IA1, Cell bc, UMI). Клеточный лизис, гибридизация поли(А)транскриптов мРНК с олиго(dT)-участками баркодов микрочастиц.





Объединение и разбиение всех капель для высвобождения частиц с мРНК. Обратная транскрипция с переключением матрицы на микрочастицах, образование кДНК.



Обработка смеси экзонуклеазой для удаления негибридизовавшихся с мРНК праймеров микрочастиц. Амплификация и очистка кДНК.



Рис. 6. Принцип метода Drop-seq (Droplets). Формат баркодирования схож с таковым у MARS-seq. Разница заключается в том, что баркоды прикреплены к микрочастицам (шарикам). Каждая микрочастица содержит множество олиго(dT)праймеров с одним и тем же клеточным баркодом (Cell_bc), адаптером «Illumina» (IA₁) и разными UMI для цифрового подсчёта молекул мРНК. Как и в случае MARS-seq, при обработке данных учитываются только 3'-транскрипты. По полученным данным секвенирования анализируют транскрипты мРНК во множестве отдельных клеток. Схема – на основе работы Macosko et al. [182] с дополнениями на основе протокола Bageritz и Raddi [183] и протокола подготовки библиотек Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide («Illumina, Inc.»)

стволовых клеток тела полипа, а кластеры интерстициальных стволовых клеток связаны как с предшественниками нейронов, так и с нематоцитами. Кроме того, были определены кластеры дифференцированных нейронов, железистых клеток, нематоцитов и половых клеток, принадлежащих интерстициальной линии [181]. Анализ дифференциальной экспрессии на уровне единичных клеток позволил идентифицировать

пространственную экспрессию эпителиальных генов вдоль орально-аборальной оси тела *Hydra* с определением ранее неохарактеризованных генов, кодирующих компоненты сигнальных путей развития (Wnt, BMP и FGF). С помощью детальных исследований интерстициальной линии клеток исследователи идентифицировали популяцию мультипотентных интерстициальных стволовых клеток, установив у них низкий уро-

вень или отсутствие экспрессии генов дифференцировки. Этот кластер клеток использовали для определения траектории развития интерстициальной линии, что выявило дифференцировку нейронов и железистых клеток через единое общее клеточное состояние, отличное от пути дифференцировки нематоцитов [181]. Применение метода ATAC-seq и его комбинирование с scRNA-seq позволило определить экспрессию транскрипционных факторов, специфичную для разных типов клеток и на разных этапах дифференцировки. Так, например, было показано, что гомеобоксный транскрипционный фактор RX задействован в развитии базального диска, а фактор транскрипции RFX функционирует в спецификации железистых клеток. Используя флуоресцентную гибридизацию in situ, научная группа сконструировала подробную молекулярную карту нервной системы *Hydra*, определив 12 различных подтипов нейронов [181].

Интересное исследование с использованием секвенирования транскриптомов единичных клеток демонстрирует молекулярно-генетическую структуру эндосимбиоза между восьмилучевым кораллом Xenia (Anthozoa) и одноклеточными динофлагеллятами [184]. Учёные использовали технологию scRNA-seq на платформе компании «10X Genomics Ins.», США. Технология секвенирования схожа с описанным выше Drop-seq. Исследователи определили 16 кластеров клеток с генами-маркёрами для каждого кластера. Отдельное внимание было уделено идентификации клеток, задействованных в эндосимбиозе. Для этого с помощью цитометра были отсортированы клетки с водорослями и клетки без них. На данных клетках провели тотальное транскриптомное секвенирование, и затем полученные данные комбинировали с данными scRNA-seq. Дополнительное применение гибридизации in situ (метода RNAscope) и микроскопии криоконсервированных срезов тканей позволили, предположительно, установить кластер клеток гастродермиса, участвующий в эндосимбиозе [184]. Исследование процесса регенерации эндосимбиотической линии Xenia после физического удаления щупалец с использованием вычислительных методов для установления псевдовремени (меры того, как далеко продвинулась клетка в ходе биологического прогресса) [185] и динамики экспрессии (ожидаемого изменения экспрессии генов в ближайшем будушем) [186] показало, что эндосимбиотические клетки существуют в пяти динамических состояниях между гомеостатическими условиями и процессом регенерации: состояние 1 – преэндосимбиотический предшественник, который через промежуточное состояние 2 переходит в состояние 3 (зрелые клетки с водорослями), а затем через промежуточное состояние 4 — в состояние 5 (постэндосимбиотические клетки). В образцах, проходящих регенерацию, обнаружен более высокий процент клеток в состояниях 1 и 2, в отличие от не регенерирующих вариантов, где оказалось больше клеток в состояниях 3—5. Показано, что пре-эндосимбиотические клетки экспрессируют лиганды молекулярного каскада Wnt (Wnt7b, Wnt11), которые могут быть задействованы в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников [184]. Данное исследование демонстрирует новую характеристику эндосимбиоза у кораллов, а также его необходимость в процессе регенерации.

Новые данные по секвенированию единичных клеток у представителя Hydrozoa C. hemisphaerica показывают пластичность разных типов клеток в условиях голодания [187]. С использованием технологии «10Х Genomics Ins.» было определено 36 клеточных популяций, составляющих 8 основных кластеров клеток С. hemisphaerica, соответствующих эпидермису, гастродермису и производным мультипотентных интерстициальных стволовых клеток (ISC). Функциональная аннотация кластеров клеток с использованием уже опубликованных данных scRNAseq и экспериментальных данных гибридизации in situ генов в целом организме позволила выявить новые типы клеток - биолюминесцентные клетки щупалец, экспрессирующие специфические эндогенные зелёные флуоресцентные белки (GFP), а также эпителиально-мышечные клетки гладкого и поперечнополосатого типа, выстилающие нижний слой колокола и велум, 6 подтипов пищеварительных клеток в гастродерме, соответствующие пищеварительным участкам в гастроваскулярной системе (желудок, гонады и бульбусы шупалец), предполагаемые механосенсорные клетки с экспрессией гомологов компонентов механосенсорного аппарата, характерного для волосковых клеток позвоночных. Особенностью медузы C. hemisphaeriса является возможность постоянной генерации разных типов клеток, особенно нейронов и нематоцитов, из пулов ISC эпидермиса бульбусов щупалец. Анализ траекторий дифференцировки клеток интерстициальной линии с изучением генной экспрессии выявил потенциально специфичные для *C. hemisphaerica* маркёрные гены. Эксперимент с реакцией на стрессовые условия в виде голодания показал, что организм не генерирует новые типы клеток в ответ на голодание, а формирует ответ за счёт изменения состояния существующих клеток. Эффект голодания был вариабельным для разных типов клеток, однако наибольшие изменения происходили в клетках

гастроваскулярной системы. Исследователи составили целую систему из кластеров клеток, в которых была детектирована дифференциальная экспрессия генов в процессе голодания, например генов ферментов оксидоредуктаз, диоксигеназ или генов лизосомального транспорта (Npc2-like), что позволило определить процессы, на которые влияет голодание, как, например метаболизм жирных кислот в клетках гастродермиса. Кроме того, высокая экспрессия генов голодания была зафиксирована в ранних ооцитах. Таким образом, голодание вызвало реорганизацию гастродермы и популяции клеток ооцитов. При этом изменения в организации гастродермы и профилей транскрипции, вызванные голоданием, опосредовали процессы самопереваривания тканей и мобилизацию гастродермальных клеток из гонад [187].

Технология секвенирования транскриптомов и эпигеномов отдельных клеток является мощным инструментом для изучения процессов развития живых организмов. Метод позволяет не только качественно охарактеризовывать разные типы клеток и конструировать карты регуляторных элементов геномов (на примере актинии N. vectensis), но и моделировать траектории развития отдельных клеточных линий (например, интерстициальных клеток у Hydrozoa). Кроме того, разрешение секвенирования на уровне единичных клеток позволяет более детально рассмотреть роль симбиотических отношений между разными организмами в процессах развития и регенерации (на примере коралла Xenia), а также установить клеточные и регуляторные механизмы процессов, происходящих в отдельных организмах в ответ на стрессовые условия (на примере гидромедузы *C. hemisphaerica*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стрекающие представляют собой уникальную группу животных с особенными характеристиками, связанными со строением, эволюцией, жизненными циклами, регенеративными способностями и процессами развития. Данные особенности обусловливают научный интерес к этим животным, которые активно используются в качестве различных модельных объектов. Огромное количество исследований посвящено изучению процессов раннего развития разнообразных представителей Cnidaria. Использование технологий широкомасштабного высокопроизводительного секвенирования поспособствовало выявлению эволюционно консервативных механизмов молекулярно-генетического контроля этапов раннего развития Стрекающих и возможности их сопоставления с эмбриональным развитием высших Metazoa. Развитие технологий секвенирования нового поколения в области геномики, транскриптомики и эпигеномики как на уровне тканей, так и единичных клеток позволило проводить более глубокие исследования структуры и регуляторных функций генома, особенностей экспрессии определённых генов и разных типов клеток в пределах одного организма. Использование методов широкомасштабного секвенирования вывело научные знания в области характеристики особенностей приспособленности Стрекающих к стрессовым условиям окружающей среды, изучения жизненных циклов (в частности, уникального обратного развития), исследования стволовых клеток и механизмов развития на новый уровень. Эти данные несут в себе важную информацию не только с точки зрения фундаментального научного интереса, но и с точки зрения развития активно использующихся в прикладных областях технологий широкомасштабного секвенирования.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке НТУ «Сириус» и Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-51015. Гусев Ф.Е. (описание эпигенетических подходов) был поддержан Научно-технологическим университетом «Сириус».

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

- Schierwater, B., Eitel, M., Jakob, W., Osigus, H.-J., Hadrys, H., et al. (2009) Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis, *PLoS Biol.*, 7, e20-e20, doi: 10.1371/ journal.pbio.1000020.
- 2. Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., and Holstein, T. W. (2009) Cnidocyst structure and the biomechanics of dis-

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

charge, *Toxicon*, **54**, 1038-1045, doi: 10.1016/j.toxicon. 2009.03.006.

- Davy, S. K., Allemand, D., and Weis, V. M. (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76, 229-261, doi: 10.1128/MMBR.05014-11.
- 4. Goulet, T. L., and Goulet, D. (2021) Climate change leads to a reduction in symbiotic derived cnidarian biodiversity

7*

on coral reefs, Front. Ecol. Evol., 9, doi: 10.3389/fevo.2021. 636279.

- 5. Horton, T., Kroh, A., Ahyong, S., Bailly, N., Bieler, R., et al. (2021) World Register of Marine Species (WoRMS), WoRMS Editorial Board.
- Diller, W. F. (1940) The Invertebrates: The Invertebrates: 6. Protozoa through Ctenophora (Hyman, L. B., ed.) 726 pp. McGraw-Hill Publications in the Zoological Sciences. A. Franklin Shull, consulting editor, *Science*, **92**, 219-220, doi: 10.1126/science.92.2384.219.b.
 7. Folino-Rorem, N. C. (2015) *Chapter 9 – Phylum Cnidaria*.
- in Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition) (Thorp, J. H., and Rogers, D. C., eds.) Academic Press, Boston, pp. 159-179.
- 8. Grimmelikhuijzen, C. J., and Westfall, J. A. (1995) The nervous systems of cnidarians, *EXS*, **72**, 7-24, doi: 10.1007/978-3-0348-9219-3_2.
- 9 Galliot, B., and Quiquand, M. (2011) A two-step process in the emergence of neurogenesis, Eur. J. Neurosci., 34, 847-862, doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07829.x.
- Khabibulina, V. R., and Starunov, V. V. (2020) FMRFamide immunoreactive nervous system in the adult 10. Cassiopeia xamachana scyphopolyp and at the early stages of planuloid formation, Invertebr. Zool., 17, 371-384,
- doi: 10.15298/invertzool.17.4.03.
 Rentzsch, F., Juliano, C., and Galliot, B. (2019) Modern genomic tools reveal the structural and cellular diversity of cnidarian nervous systems, Curr. Opin. Neurobiol., 56, 87-96, doi: 10.1016/j.conb.2018.12.004.
- Tournière, O., Dolan, D., Richards, G. S., Sunagar, K., Columbus-Shenkar, Y. Y., et al. (2020) NvPOU4/Brain3 Functions as a terminal selector gene in the nervous system of the cnidarian Nematostella vectensis, Cell Rep., 30, 4473-4489.e4475, doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.031
- Watanabe, H., Fujisawa, T., and Holstein, T. W. (2009) Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system, *Dev. Growth Differ.*, **51**, 167-183, doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01103.x.
- 14. Leclère, L., and Röttinger, E. (2016) Diversity of cnidarian muscles: Function, anatomy, development and regeneration, Front. Cell Dev. Biol., 4, 157, doi: 10.3389/fcell. 2016.00157.
- Berzins, I. K., Yanong, R. P. E., LaDouceur, E. E. B., and Peters, E. C. (2021) Cnidaria, in *Invertebrate Histology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 55-86.
 Cole, A. G., Kaul, S., Jahnel, S. M., Steger, J., Zimmerman, B., et al. (2020) Muscle cell type diversifica-tion facilitated hy anterprint and duriliarity bioRvin
- tion facilitated by extensive gene duplications, bioRxiv, doi: 10.1101/2020.07.19.210658.
- Okamura, B., and Gruhl, A. (2021) Evolution, Origins and Diversification of Parasitic Cnidarians, in *The Evolution* and Fossil Record of Parasitism: Identification and Macroevolution of Parasites (De Baets, K., and Huntley, J. W., eds.) Springer International Publishing, Cham, pp. 109-152.
- Chang, E. S., Neuhof, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., et al. (2015) Genomic insights 18. into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, 14912-14917, doi: 10.1073/pnas.1511468112.
- Kayal, E., Bentlage, B., Sabrina Pankey, M., Ohdera, A. H., Medina, M., et al. (2018) Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits, BMC Evol. Biol., 18, 68, doi: 10.1186/s12862-018-1142-0.
- Kayal, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, A. G., and Lavrov, D. V. (2013) Cnidarian phylogenetic relationships 20. as revealed by mitogenomics, BMC Evol. Biol., 13, 5, doi: 10.1186/1471-2148-13-5.
- Zapata, F., Goetz, F. E., Smith, S. A., Howison, M., 21. Siebert, S., et al. (2015) Phylogenomic analyses support traditional relationships within Cnidaria, *PLoS One*, **10**, e0139068, doi: 10.1371/journal.pone.0139068.

- 22. Technau, U., and Steele, R. E. (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria, Development, **138**, 1447-1458, doi: 10.1242/dev.048959. Osadchenko, B. V., and Kraus, Y. A. (2018) Trachylina:
- 23. The group that remains enigmatic despite 150 years of investigations, *Russ. J. Dev. Biol.*, **49**, 134-145, doi: 10.1134/S1062360418030074.
- 24. Maronna, M. M., Miranda, T. P., Peña Cantero, A. L., Barbeitos, M. S., and Marques, A. C. (2016) Towards a phylogenetic classification of Leptothecata (Cnidaria, Hydrozoa), *Sci. Rep.*, **6**, 18075, doi: 10.1038/srep18075. 25. Piraino, S., Vito, D. J., Schmich, J. R., Bouillon, J. P.,
- and Boero, F. (2004) Reverse development in Cnidaria, *Can. J. Zool.*, **82**, 1748-1754, doi: 10.1139/z04-174.
- Ballesteros, A., Östman, C., Santín, A., Marambio, M., 26. Narda, M., et al. (2021) Cnidome and morphological features of Pelagia noctiluca (Cnidaria: Scyphozoa) throughout the different life cycle stages, Front. Mar. Sci., 8, 1059, doi: 10.3389/fmars.2021.714503.
- 27. Piraino, S., Boero, F., Aeschbach, B., and Schmid, V. (1996) Reversing the life cycle: Medusae transforming into polyps and cell transdifferentiation in Turritopsis nutricula (Cnidaria, Hydrozoa), *Biol. Bull.*, **190**, 302-312, doi: 10.2307/1543022.
- He, J., Zheng, L., Zhang, W., and Lin, Y. (2015) Life Cycle 28. Reversal in *Aurelia* sp. 1 (Cnidaria, Scyphozoa), *PLoS One*, **10**, e0145314, doi: 10.1371/journal.pone.0145314.
- 29. Babonis, L. S., and Martindale, M. Q. (2017) Phylogenetic evidence for the modular evolution of metazoan signalling pathways, Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci., 372, 20150477, doi: 10.1098/rstb.2015.0477.
- Chapman, J. A., Kirkness, E. F., Simakov, O., Hampson, S. E., Mitros, T., et al. (2010) The dynamic genome of *Hydra*, *Nature*, 464, 592-596, doi: 10.1038/nature08830.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., et al. (2007) Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization, Science, 317, 86-94, doi: 10.1126/science. 1139158.
- 32. Kanehisa, M., and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes, Nucleic Acids Res., 28, 27-30, doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- Khalturin, K., Shinzato, C., Khalturina, M., Hamada, M., Fujie, M., et al. (2019) Medusozoan genomes inform the 33. evolution of the jellyfish body plan, Nat. Ecol. Evol., 3, Kim, H. M., Weber, J. A., Lee, N., Park, S. G., Cho, Y. S.,
- et al. (2019) The genome of the giant Nomura's jellyfish sheds light on the early evolution of active predation, BMC Biol., 17, 28, doi: 10.1186/s12915-019-0643-7.
- Brekhman, V., Malik, A., Haas, B., Sher, N., and Lotan, T. 35. (2015) Transcriptome profiling of the dynamic life cycle of the scypohozoan jellyfish Aurelia aurita, BMC Genom., 16, 74, doi: 10.1186/s12864-015-1320-z.
- 36. Avila Soria, G. (2009) Molecular characterization of Carukia barnesi and Malo kingi, Cnidaria; Cubozoa; Carybdeidae. PhD thesis, James Cook University.
- 37. Ohdera, A., Ames, C. L., Dikow, R. B., Kayal, E., Chiodin, M., et al. (2019) Box, stalked, and upside-down? Draft genomes from diverse jellyfish (Cnidaria, Acraspeda) lineages: Alatina alata (Cubozoa), Calvadosia cruxmelitensis (Staurozoa), and Cassiopea xamachana (Scyphozoa), Gigascience, 8, giz069, doi: 10.1093/gigascience/giz069.
- Martindale, M. Q., Finnerty, J. R., and Henry, J. Q. (2002) 38. The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **24**, 358-365, doi: 10.1016/S1055-7903(02)00208-7.
- 39. Arendt, D., Tosches, M. A., and Marlow, H. (2016) From nerve net to nerve ring, nerve cord and brain – evolution of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 61-72, doi: 10.1038/nrn.2015.15.
- Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D., and Martindale, M. Q. (2004) Origins of bilateral symmetry: 40.

Hox and *Dpp* expression in a sea anemone, *Science*, **304**, 1335-1337, doi: doi:10.1126/science.1091946.

- 41. Genikhovich, G., and Technau, U. (2017) On the evolution of bilaterality, *Development*, **144**, 3392-3404, doi: 10.1242/dev.141507.
- He, S., Del Viso, F., Chen, C. Y., Ikmi, A., Kroesen, A. E., et al. (2018) An axial Hox code controls tissue segmentation and body patterning in *Nematostella vectensis*, *Science*, **361**, 1377-1380, doi: 10.1126/science.aar8384.
- Lebedeva, T., Aman, A. J., Graf, T., Niedermoser, I., Zimmermann, B., et al. (2021) Cnidarian-bilaterian comparison reveals the ancestral regulatory logic of the betacatenin dependent axial patterning, *Nat. Commun.*, 12, 4032, doi: 10.1038/s41467-021-24346-8.
- DuBuc, T. Q., Stephenson, T. B., Rock, A. Q., and Martindale, M. Q. (2018) Hox and Wnt pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation, *Nat. Commun.*, 9, 2007, doi: 10.1038/s41467-018-04184-x.
- Nat. Commun., 9, 2007, doi: 10.1038/s41467-018-04184-x.
 45. Momose, T., Derelle, R., and Houliston, E. (2008) A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*, *Development*, 135, 2105-2113, doi: 10.1242/dev.021543.
- 46. Plickert, G., Jacoby, V., Frank, U., Muller, W. A., and Mokady, O. (2006) Wnt signaling in hydroid development: formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning, *Dev. Biol.*, **298**, 368-378, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.043.
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., et al. (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*, *Nature*, 407, 186-189, doi: 10.1038/35025063.
 Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., and Bode, H. R.
- Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., and Bode, H. R. (2005) Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway, *Development*, 132, 2907-2916, doi: 10.1242/dev.01848.
- Philipp, I., Aufschnaiter, R., Ozbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., et al. (2009) Wnt/beta-catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan *Hydra*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4290-4295, doi: 10.1073/pnas.0812847106.
- Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., et al. (2009) Multiple Wnts are involved in *Hydra* organizer formation and regeneration, *Dev. Biol.*, 330, 186-199, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.02.004.
- Nakamura, Y., Tsiairis, C. D., Özbek, S., and Holstein, T. W. (2011) Autoregulatory and repressive inputs localize *Hydra* Wnt3 to the head organizer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 108, 9137-9142, doi: 10.1073/pnas.1018109108.
- Reddy, P. C., Gungi, A., Ubhe, S., Pradhan, S. J., Kolte, A., et al. (2019) Molecular signature of an ancient organizer regulated by Wnt/β-catenin signalling during primary body axis patterning in *Hydra*, *Commun. Biol.*, 2, 1-11, doi: 10.1038/s42003-019-0680-3.
- 53. Wang, R., Steele, R. E., and Collins, E.-M. S. (2020) Wht signaling determines body axis polarity in regenerating *Hydra* tissue fragments, *Dev. Biol.*, **467**, 88-94, doi: 10.1016/j.ydbio.2020.08.012.
- Moneer, J., Siebert, S., Krebs, S., Cazet, J., Prexl, A., et al. (2021) Differential gene regulation in DAPT-treated *Hydra* reveals candidate direct Notch signalling targets, *J. Cell Sci.*, 134, jcs258768, doi: 10.1242/jcs.258768.
- J. Cell Sci., 134, jcs258768, doi: 10.1242/jcs.258768.
 55. Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., et al. (2005) Unexpected complexity of the *Wnt* gene family in a sea anemone, *Nature*, 433, 156-160, doi: 10.1038/nature03158.
- Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., et al. (2003) An ancient role for nuclear βcatenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation, *Nature*, **426**, 446-450, doi: 10.1038/ nature02113.
- Lee, P. N., Kumburegama, S., Marlow, H. Q., Martindale, M. Q., and Wikramanayake, A. H. (2007) Asymmetric developmental potential along the animal-vegetal axis in

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled, *Dev. Biol.*, **310**, 169-186, doi: 10.1016/ j.ydbio.2007.05.040. Trevino, M., Stefanik, D. J., Rodriguez, R., Harmon, S.,

- Trevino, M., Stefanik, D. J., Rodriguez, R., Harmon, S., and Burton, P. M. (2011) Induction of canonical Wnt signaling by alsterpaullone is sufficient for oral tissue fate during regeneration and embryogenesis in *Nematostella vectensis*, *Dev. Dyn.*, **240**, 2673-2679, doi: 10.1002/dvdy. 22774.
- 59. Kirillova, A., Genikhovich, G., Pukhlyakova, E., Demilly, A., Kraus, Y., et al. (2018) Germ-layer commitment and axis formation in sea anemone embryonic cell aggregates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 1813-1818, doi: 10.1073/pnas.1711516115.
- doi: 10.1073/pnas.1711516115.
 Ryan, J. F., Mazza, M. E., Pang, K., Matus, D. Q., Baxevanis, A. D., et al. (2007) Pre-bilaterian origins of the Hox cluster and the Hox code: Evidence from the sea anemone, *Nematostella vectensis*, *PLoS One*, 2, e153, doi: 10.1371/journal.pone.0000153.
- Genikhovich, G., Fried, P., Prünster, M. M., Schinko, J. B., Gilles, A. F., et al. (2015) Axis patterning by BMPs: Cnidarian network reveals evolutionary constraints, *Cell Rep.*, 10, 1646-1654, doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.035.
- Matus, D. Q., Magie, C. R., Pang, K., Martindale, M. Q., and Thomsen, G. H. (2008) The Hedgehog gene family of the cnidarian, *Nematostella vectensis*, and implications for understanding metazoan Hedgehog pathway evolution, *Dev. Biol.*, **313**, 501-518, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.032.
- Saina, M., Genikhovich, G., Renfer, E., and Technau, U. (2009) BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 18592-18597, doi: 10.1073/pnas.0900151106.
- Leclère, L., and Rentzsch, F. (2014) RGM regulates BMPmediated secondary axis formation in the sea anemone *Nematostella vectensis*, *Cell Rep.*, 9, 1921-1930, doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.009.
- Kraus, Y., Aman, A., Technau, U., and Genikhovich, G. (2016) Pre-bilaterian origin of the blastoporal axial organizer, *Nat. Commun.*, 7, 11694, doi: 10.1038/ ncomms11694.
- Momose, T., and Schmid, V. (2006) Animal pole determinants define oral-aboral axis polarity and endodermal cellfate in hydrozoan jellyfish *Podocoryne carnea*, *Dev. Biol.*, 292, 371-380, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.012.
- Duffy, D. J., Plickert, G., Kuenzel, T., Tilmann, W., and Frank, U. (2010) Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in *Hydractinia* metamorphosis and regeneration, *Development*, **137**, 3057-3066, doi: 10.1242/ dev.046631.
- Momose, T., and Houliston, E. (2007) Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo, *PLoS Biol.*, 5, e70, doi: 10.1371/journal.pbio. 0050070.
- 69. Technau, U. (2020) Gastrulation and germ layer formation in the sea anemone *Nematostella vectensis* and other cnidarians, *Mech. Dev.*, **163**, 103628, doi: 10.1016/j.mod. 2020.103628.
- Kraus, Y. A., and Markov, A. V. (2017) Gastrulation in Cnidaria: The key to an understanding of phylogeny or the chaos of secondary modifications? *Biol. Bull. Rev.*, 7, 7-25, doi: 10.1134/S2079086417010029.
 Röttinger, E., Dahlin, P., and Martindale, M. Q. (2012) A
- Röttinger, E., Dahlin, P., and Martindale, M. Q. (2012) A framework for the establishment of a cnidarian gene regulatory network for "endomesoderm" specification: The inputs of β-catenin/TCF signaling, *PLoS Genet.*, 8, e1003164, doi: 10.1371/journal.pgen.1003164.
- referring and germ cell development in the sea anemone Nematostella vectensis, Elife, 9, e54573, doi: 10.7554/eLife.54573.
- doi: 10.7554/eLife.54573.
 73. Wijesena, N. M. (2012) Wht Signaling in the Cnidarian Nematostella vectensis: Insights into the Evolution of

Gastrulation. PhD thesis, University of Miami, Coral Gables.

- Leclère, L., Bause, M., Sinigaglia, C., Steger, J., and Rentzsch, F. (2016) Development of the aboral domain in *Nematostella* requires β-catenin and the opposing activities of Six3/6 and Frizzled5/8, *Development*, **143**, 1766-1777, doi: 10.1242/dev.120931.
- Wijesena, N., Sun, H., Kumburegama, S., and Wikramanayake, A. H. (2021) Distinct Frizzled receptors independently mediate endomesoderm specification and primary arch on invagination during gastrulation in *Nematostella*, *Dev. Biol.*, **481**, 215-225, doi: 10.1016/ j.ydbio.2021.11.002.
 Vetrova, A. A., Lebedeva, T. S., Saidova, A. A., Kupaeva,
- Vetrova, A. A., Lebedeva, T. S., Saidova, A. A., Kupaeva, D. M., Kraus, Y. A., et al. (2021) From apolar gastrula to polarized larva: Embryonic development of a marine hydroid, *Dynamena pumila*, *Dev. Dyn.*, 1-31, doi: 10.1002/ dvdy.439.
- 77. Kraus, Y., Flici, H., Hensel, K., Plickert, G., Leitz, T., and Frank, U. (2014) The embryonic development of the cnidarian *Hydractinia echinata*, *Evol Dev*, **16**, 323-338, doi: 10.1111/ede.12100.
- Momose, T, Kraus, Y, and Houliston, E. (2012) A conserved function for Strabismus in establishing planar cell polarity in the ciliated ectoderm during cnidarian larval development, *Development*, **139**, 4374-4382, doi: 10.1242/dev.084251.
- Fröbius, A. C., Genikhovich, G., Kürn, U., Anton-Erxleben, F., and Bosch, T. C. G. (2003) Expression of developmental genes during early embryogenesis of *Hydra*, *Dev. Genes Evol.*, 213, 445-455, doi: 10.1007/s00427-003-0344-6.
- Siebert, S., and Juliano, C. E. (2017) Sex, polyps, and medusae: Determination and maintenance of sex in cnidarians, *Mol. Reprod. Dev.*, 84, 105-119, doi: 10.1002/ mrd.22690.
- Technau, U., Miller, M. A., Bridge, D., and Steele, R. E. (2003) Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis, *Dev. Biol.*, 260, 191-206, doi: 10.1016/S0012-1606(03)00241-0.
- Айзенштадт Т. Б. (1980) Исследование оогенеза у гидры. IV. Фагоцитарная активность ооцитов, *Онтогенез*, 11, 31-38.
- Rentzsch, F., Hobmayer, B., and Holstein, T. W. (2005) Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in *Hydra* gametogenesis, *Dev. Biol.*, 278, 1-12, doi: 10.1016/ j.ydbio.2004.10.007.
- Kasbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C. N., Dall'armi, E., et al. (2007) The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*, *Dev. Biol.*, **303**, 376-390, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.022.
- 85. Hobmayer, B., Rentzsch, F., and Holstein, T. W. (2001) Identification and expression of HySmad1, a member of the R-Smad family of TGFbeta signal transducers, in the diploblastic metazoan *Hydra*, *Dev. Genes Evol.*, **211**, 597-602, doi: 10.1007/s00427-001-0198-8.
- Miller, M. A., and Steele, R. E. (2000) Lemon encodes an unusual receptor protein-tyrosine kinase expressed during gametogenesis in *Hydra*, *Dev. Biol.*, **224**, 286-298, doi: 10.1006/dbio.2000.9786.
- Amiel, A., and Houliston, E. (2009) Three distinct RNA localization mechanisms contribute to oocyte polarity establishment in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*, *Dev. Biol.*, **327**, 191-203, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.12. 007.
- Houliston, E., Leclère, L., Munro, C., Copley, R., and Momose, T. (2021) Past, present and future of *Clytia hemis-phaerica* as a laboratory jellyfish, hal-03346217.
 Sanders, S. M., Shcheglovitova, M., and Cartwright, P.
- Sanders, S. M., Shcheglovitova, M., and Cartwright, P. (2014) Differential gene expression between functionally specialized polyps of the colonial hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* (Phylum Cnidaria), *BMC Genomics*, 15, 406, doi: 10.1186/1471-2164-15-406.

- 90. Eckelbarger, K. J., Hand, C., and Uhlinger, K. R. (2008) Ultrastructural features of the trophonema and oogenesis in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis* (Edwardsiidae), *Invertebrate Biol.*, **127**, 381-395, doi: 10.1111/j.1744-7410.2008.00146.x.
- Бочарова Е. С., Косевич И. А. (2011) Варианты размножения актиний (CNIDARIA, ANTHOZOA), Зоологический журнал, 90, 1283-1295.
- 92. Reuven, S., Rinsky, M., Brekhman, V., Malik, A., Levy, O., et al. (2021) Cellular pathways during spawning induction in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, *Sci. Rep.*, **11**, 15451, doi: 10.1038/s41598-021-95033-3.
- Chiu, Y.-L., Shikina, S., Yoshioka, Y., Shinzato, C., and Chang, C.-F. (2020) *De novo* transcriptome assembly from the gonads of a scleractinian coral, *Euphyllia ancora*: molecular mechanisms underlying scleractinian gametogenesis, *BMC Genomics*, **21**, 732, doi: 10.1186/s12864-020-07113-9.
- 95. Nakanishi, N., Renfer, E., Technau, U., and Rentzsch, F. (2012) Nervous systems of the sea anemone *Nematostella vectensis* are generated by ectoderm and endoderm and shaped by distinct mechanisms, *Development*, **139**, 347-357, doi: 10.1242/dev.071902.
- 96. Al-Shaer, L., Havrilak, J., and Layden, M. (2021) Nematostella vectensis as a Model System. in Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology, CRC Press, Boca Raton, pp. 107-128.
- Yuan, D., Nakanishi, N., Jacobs, D. K., and Hartenstein, V. (2008) Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia*, *Dev. Genes Evol.*, 218, 525-539, doi: 10.1007/s00427-008-0254-8.
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., et al. (2009) Origins of neurogenesis, a cnidarian view, *Dev. Biol.*, 332, 2-24, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.563.
- 99. Gahan, J. M., Schnitzler, C. E., DuBuc, T. Q., Doonan, L. B., Kanska, J., et al. (2017) Functional studies on the role of Notch signaling in *Hydractinia* development, *Dev. Biol.*, 428, 224-231, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.06.006.
- 100. Wang, W. (2013) Regulation of metamorphosis and the evolution of life cycles: insights from the common moon jelly A. aurita. PhD thesis, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
- 101. Watanabe, H., Kuhn, A., Fushiki, M., Agata, K., Özbek, S., et al. (2014) Sequential actions of β-catenin and Bmp pattern the oral nerve net in *Nematostella vectensis*, *Nat. Commun.*, 5, 5536, doi: 10.1038/ncomms6536.
- 102. Duffy, D. J., and Frank, U. (2011) Modulation of COUP-TF expression in a cnidarian by ectopic Wnt signalling and allorecognition, *PLoS One*, 6, e19443, doi: 10.1371/journal. pone.0019443.
- 103. Matus, D. Q., Thomsen, G. H., and Martindale, M. Q. (2007) FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian, *Dev. Genes Evol.*, 217, 137-148, doi: 10.1007/s00427-006-0122-3.
- 104. Rentzsch, F., Fritzenwanker, J. H., Scholz, C. B., and Technau, U. (2008) FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*, *Development*, **135**, 1761-1769, doi: 10.1242/dev. 020784.
- 105. Layden, M. J., Johnston, H., Amiel, A. R., Havrilak, J., Steinworth, B., et al. (2016) MAPK signaling is necessary for neurogenesis in *Nematostella vectensis*, *BMC Biol.*, 14, 61, doi: 10.1186/s12915-016-0282-1.
- 106. Turwankar, A., and Ghaskadbi, S. (2019) VEGF and FGF signaling during head regeneration in hydra, *Gene*, **717**, 144047, doi: 10.1016/j.gene.2019.144047.
- 144047, doi: 10.1016/j.gene.2019.144047. 107. Fujita, S., Kuranaga, E., and Nakajima, Y.-I. (2021) Regeneration potential of jellyfish: Cellular mechanisms

and molecular insights, *Genes*, **12**, 758, doi: 10.3390/genes12050758.

- 108. Röttinger, E. (2021) Nematostella vectensis, an emerging model for deciphering the molecular and cellular mechanisms underlying whole-body regeneration, Cells, 10, 2692, doi: 10.3390/cells10102692.
- 109. Vogg, M. C., Buzgariu, W., Suknovic, N. S., and Galliot, B. (2021) Cellular, metabolic, and developmental dimensions of whole-body regeneration in *Hydra*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 13, doi: 10.1101/cshperspect. a040725.
- 110. Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., et al. (2009) Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration, *Dev. Cell*, **17**, 279-289, doi: 10.1016/j.devcel.2009.07.014.
- 111. Gufler, S., Artes, B., Bielen, H., Krainer, I., Eder, M. K., et al. (2018) β-Catenin acts in a position-independent regeneration response in the simple eumetazoan *Hydra*, *Dev. Biol.*, 433, 310-323, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.005.
- 112. Vogg, M. C., Beccari, L., Iglesias Ollé, L., Rampon, C., Vriz, S., et al. (2019) An evolutionarily-conserved Wnt3/βcatenin/Sp5 feedback loop restricts head organizer activity in *Hydra*, *Nat. Commun.*, **10**, 312, doi: 10.1038/s41467-018-08242-2.
- 113. Technau, U., Cramer von Laue, C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., et al. (2000) Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12127-12131, doi: 10.1073/pnas.97.22.12127.
- 111 Augura aggregates, 1702. 14th. Acad. 502. 053, 77, 12127-12131, doi: 10.1073/pnas.97.22.12127.
 114. Ferenc, J., Papasaikas, P., Ferralli, J., Nakamura, Y., Smallwood, S., et al. (2020) Wnt3 expression as a readout of tissue stretching during *Hydra* regeneration, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.22.423911.
- 115. Tursch, A., Bartsch, N., and Holstein, T. W. (2020) MAPK signaling links the injury response to Wnt-regulated patterning in *Hydra* regeneration, *bioRxiv*, doi: 10.1101/ 2020.07.06.189795.
- Chera, S., Ghila, L., Wenger, Y., and Galliot, B. (2011) Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration, *Dev. Growth Differ.*, 53, 186-201, doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01250.x.
 Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N.,
- 117. Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., et al. (2013) Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*, *Dev. Biol.*, 383, 146-157, doi: 10.1016/j.ydbio.2013.08.022.
- 118. Wenger, Y., Buzgariu, W., Perruchoud, C., Loichot, G., and Galliot, B. (2019) Generic and context-dependent gene modulations during *Hydra* whole body regeneration, *bioRxiv*, doi: 10.1101/587147.
- 119. Kaloulis, K. (2001) Molecular Basis of Morphogenetic Events in Hydra: Study of the CREB and Hedgehog Pathways during Budding and Regeneration. PhD thesis, Université de Genève, Genève.
- 120. Bradshaw, B., Thompson, K., and Frank, U. (2015) Distinct mechanisms underlie oral vs aboral regeneration in the cnidarian *Hydractinia echinata*, *eLife*, **4**, e05506, doi: 10.7554/eLife.05506.
- Sinigaglia, Ć., Peron, S., Eichelbrenner, J., Chevalier, S., Steger, J., et al. (2020) Pattern regulation in a regenerating jellyfish, *Elife*, 9, e54868, doi: 10.7554/eLife.54868.
- 122. Cartwright, P., Travert, M. K., and Sanders, S. M. (2021) The evolution and development of coloniality in hydrozoans, J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol., 336, 293-299, doi: 10.1002/jez.b.22996.
- 123. Bagaeva, T. S., Kupaeva, D. M., Vetrova, A. A., Kosevich, I. A., Kraus, Y. A., et al. (2019) cWnt signaling modulation results in a change of the colony architecture in a hydrozoan, *Dev. Biol.*, **456**, 145-153, doi: 10.1016/j.ydbio. 2019.08.019.
- 124. Muller, W., Frank, U., Teo, R., Mokady, O., Guette, C., et al. (2007) Wht signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3beta inhibitors, *Int. J. Dev. Biol.*, **51**, 211-220, doi: 10.1387/ijdb.62247wm.

- 125. Hou, S., Zhu, J., Shibata, S., Nakamoto, A., and Kumano, G. (2021) Repetitive accumulation of interstitial cells generates the branched structure of *Cladonema* medusa tentacles, *Development*, **148**, doi: 10.1242/dev. 199544.
- 126. DuBuc, T. Q., Traylor-Knowles, N., and Martindale, M. Q. (2014) Initiating a regenerative response; cellular and molecular features of wound healing in the cnidarian *Nematostella vectensis*, *BMC Biol.*, **12**, 24, doi: 10.1186/1741-7007-12-24.
- 127. Stewart, Z. K., Pavasović, A., Hock, D. H., and Prentis, P. J. (2017) Transcriptomic investigation of wound healing and regeneration in the cnidarian *Calliactis polypus*, *Sci. Rep.*, 7, 41458, doi: 10.1038/srep41458.
- 128. Luz, B. L. P., Miller, D. J., and Kitahara, M. V. (2021) High regenerative capacity is a general feature within colonial dendrophylliid corals (Anthozoa, Scleractinia), *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **336**, 281-292, doi: 10.1002/jez. b.23021.
- 129. Van der Burg, C. A., and Prentis, P. J. (2021) The Tentacular Spectacular: Evolution of regeneration in sea anemones, *Genes*, **12**, 1072, doi: 10.3390/ genes12071072.
- 130. Böttger, A., and Hassel, M. (2012) *Hydra*, a model system to trace the emergence of boundaries in developing eumetazoans, *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, 583-591, doi: 10.1387/ ijdb.113454ab.
- 131. Mortzfeld, B. M., Taubenheim, J., Klimovich, A. V., Fraune, S., Rosenstiel, P., et al. (2019) Temperature and insulin signaling regulate body size in *Hydra* by the Wnt and TGF-beta pathways, *Nat. Commun.*, **10**, 3257, doi: 10.1038/s41467-019-11136-6.
- 132. Seipel, K., and Schmid, V. (2006) Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae, *Int. J. Dev. Biol.*, **50**, 589-599, doi: 10.1387/ijdb.062150ks.
- 133. Pennati, R., Dell'Anna, A., Pagliara, P., Scarì, G., Piraino, S., et al. (2013) Neural system reorganization during metamorphosis in the planula larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria), *Zoomorphology*, **132**, 227-237, doi: 10.1007/s00435-013-0188-1.
- Seipp, S., Schmich, J., Will, B., Schetter, E., Plickert, G., et al. (2010) Neuronal cell death during metamorphosis of *Hydractina echinata* (Cnidaria, Hydrozoa), *Invertebrate Neurosci.*, **10**, 77-91, doi: 10.1007/s10158-010-0109-7.
 Stumpf, M., Will, B., Wittig, K., Kasper, J., Fischer, B.,
- 135. Stumpf, M., Will, B., Wittig, K., Kasper, J., Fischer, B., et al. (2010) An organizing region in metamorphosing hydrozoan planula larvae – stimulation of axis formation in both larval and in adult tissue, *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 795-802, doi: 10.1387/ijdb.082738ms.
- 136. Krasovec, G., Pottin, K., Rosello, M., Quéinnec, É., and Chambon, J.-P. (2021) Apoptosis and cell proliferation during metamorphosis of the planula larva of *Clytia hemi-sphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria), *Dev. Dyn.*, **250**, 1739-1758, doi: 10.1002/dvdy.376.
- 137. Seipel, K., Eberhardt, M., Müller, P., Pescia, E., Yanze, N., et al. (2004) Homologs of vascular endothelial growth factor and receptor, VEGF and VEGFR, in the jellyfish *Podocoryne carnea*, *Dev. Dyn.*, 231, 303-312, doi: 10.1002/dvdy.20139.
- 138. Sanders, S. M., and Cartwright, P. (2015) Patterns of Wnt signaling in the life cycle of *Podocoryna carnea* and its implications for medusae evolution in Hydrozoa (Cnidaria), *Evol. Dev.*, **17**, 325-336, doi: 10.1111/ede. 12165.
- 139. Nawrocki, A. M., and Cartwright, P. (2013) Expression of Wnt pathway genes in polyps and medusa-like structures of *Ectopleura larynx* (Cnidaria: Hydrozoa), *Evol. Dev.*, 15, 373-384, doi: 10.1111/ede.12045.
- 140. Gold, D. A., Nakanishi, N., Hensley, N. M., Hartenstein, V., and Jacobs, D. K. (2016) Cell tracking supports secondary gastrulation in the moon jellyfish *Aurelia, Dev. Genes Evol.*, **226**, 383-387, doi: 10.1007/ s00427-016-0559-y.

- 141. Rentzsch, F., Anton, R., Saina, M., Hammerschmidt, M., Holstein, T. W., et al. (2006) Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: Implications for the evolution of axial patterning, *Dev. Biol.*, **296**, 375-387, doi: 10.1016/ j.ydbio.2006.06.003.
- 142. Strader, M. E., Aglyamova, G. V., and Matz, M. V. (2018) Molecular characterization of larval development from fertilization to metamorphosis in a reef-building coral, *BMC Genom.*, **19**, 17, doi: 10.1186/s12864-017-4392-0.
- Steele, R. E. (2002) Developmental signaling in *Hydra*: What does it take to build a "simple" animal? *Dev. Biol.*, 248, 199-219, doi: doi.org/10.1006/dbio.2002.0744.
- 144. Leclère, L., Horin, C., Chevalier, S., Lapebie, P., Dru, P., et al. (2019) The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle, *Nat. Ecol. Evol.*, **3**, 801-810, doi: 10.1038/s41559-019-0833-2.
- Lisenkova, A. A., Grigorenko, A. P., Tyazhelova, T. V., Andreeva, T. V., Gusev, F. E., et al. (2017) Complete mitochondrial genome and evolutionary analysis of *Turritopsis dohrnii*, the "immortal" jellyfish with a reversible lifecycle, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **107**, 232-238, doi: 10.1016/ j.ympev.2016.11.007.
 Shinzato, C., Khalturin, K., Inoue, J., Zayasu, Y.,
- Shinzato, C., Khalturin, K., Inoue, J., Zayasu, Y., Kanda, M., et al. (2020) Eighteen coral genomes reveal the evolutionary origin of acropora strategies to accommodate environmental changes, *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 16-30, doi: 10.1093/molbev/msaa216.
 Fuchs, B., Wang, W., Graspeuntner, S., Li, Y., Insua, S.,
- 147. Fuchs, B., Wang, W., Graspeuntner, S., Li, Y., Insua, S., et al. (2014) Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*, *Curr. Biol.*, 24, 263-273, doi: 10.1016/ j.cub.2013.12.003.
- 148. Ge, J., Liu, C., Tan, J., Bian, L., and Chen, S. (2018) Transcriptome analysis of scyphozoan jellyfish *Rhopilema esculentum* from polyp to medusa identifies potential genes regulating strobilation, *Dev. Genes Evol.*, **228**, 243-254, doi: 10.1007/s00427-018-0621-z.
- 149. Nielsen, S. K. D., Koch, T. L., Hauser, F., Garm, A., and Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2019) *De novo* transcriptome assembly of the cubomedusa *Tripedalia cystophora*, including the analysis of a set of genes involved in peptidergic neurotransmission, *BMC Genomics*, 20, 175, doi: 10.1186/ s12864-019-5514-7.
- 150. Duncan, E. J., Gluckman, P. D., and Dearden, P. K. (2014) Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **322**, 208-220, doi: 10.1002/jez.b.22571.
- Moore, L. D., Le, T., and Fan, G. (2013) DNA methylation and its basic function, *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38, doi: 10.1038/npp.2012.112.
- Henderson, I. R., and Jacobsen, S. E. (2007) Epigenetic inheritance in plants, *Nature*, 447, 418-424, doi: 10.1038/ nature05917.
- 153. Sarda, S., Zeng, J., Hunt, B. G., and Yi, S. V. (2012) The evolution of invertebrate gene body methylation, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 1907-1916, doi: 10.1093/molbev/ mss062.
- 154. Illumina. Methylation Sequencing, URL: https:// www.illumina.com/techniques/sequencing/methylationsequencing.html, Accessed 25.10.2021.
- 155. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., et al. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1827-1831, doi: 10.1073/pnas.89.5.1827.
- 156. Masser, D. R., Hadad, N., Porter, H., Stout, M. B., Unnikrishnan, A., et al. (2018) Analysis of DNA modifications in aging research, *Geroscience*, **40**, 11-29, doi: 10.1007/s11357-018-0005-3.
- 157. Li, Y., Liew, Y. J., Cui, G., Cziesielski, M. J., Zahran, N., et al. (2018) DNA methylation regulates transcriptional homeostasis of algal endosymbiosis in the coral model *Aiptasia*, *Sci. Adv.*, **4**, eaat2142, doi: 10.1126/sciadv.aat2142.

- 158. Dimond, J. L., Nguyen, N., and Roberts, S. B. (2021) DNA methylation profiling of a cnidarian-algal symbiosis using nanopore sequencing, *G3 (Bathesda)*, **11**, jkab148, doi: 10.1093/g3journal/jkab148.
- Dixon, G. B., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2014) Bimodal signatures of germline methylation are linked with gene expression plasticity in the coral *Acropora millepora*, *BMC Genomics*, **15**, 1109, doi: 10.1186/1471-2164-15-1109.
 Dixon, G., Liao, Y., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2018) Place of the second second
- 160. Dixon, G., Liao, Y., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2018) Role of gene body methylation in acclimatization and adaptation in a basal metazoan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 13342-13346, doi: 10.1073/pnas.1813749115.
- 161. Dixon, G. B., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2016) Evolutionary consequences of DNA methylation in a basal metazoan, *Mol. Biol. Evol.*, 33, 2285-2293, doi: 10.1093/ molbev/msw100.
- 162. Hassel, M., Cornelius, M. G., Vom Brocke, J., and Schmeiser, H. H. (2010) Total nucleotide analysis of *Hydra* DNA and RNA by MEKC with LIF detection and 32Ppostlabeling, *Electrophoresis*, **31**, 299-302, doi: 10.1002/ elps.200900458.
- 163. Pillai, A., Gungi, A., Reddy, P. C., and Galande, S. (2021) Epigenetic regulation in *Hydra*: Conserved and divergent roles, *Front. Cell Dev. Biol.*, 9, 663208, doi: 10.3389/fcell. 2021.663208.
- 164. Kyger, R., Luzuriaga-Neira, A., Layman, T., Milkewitz Sandberg, T. O., Singh, D., et al. (2021) Myxosporea (Myxozoa, Cnidaria) lack DNA cytosine methylation, *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 393-404, doi: 10.1093/molbev/msaa214.
- 165. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., and Greenleaf, W. J. (2013) Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position, *Nat. Methods*, **10**, 1213-1218, doi: 10.1038/nmeth.2688.
- 166. Weizman, E. N., Tannenbaum, M., Tarrant, A. M., Hakim, O., and Levy, O. (2019) Chromatin dynamics enable transcriptional rhythms in the cnidarian *Nematostella vectensis*, *PLoS Genet.*, **15**, e1008397, doi: 10.1371/journal.pgen.1008397.
- 167. Weizman, E., Rinsky, M., Simon-Blecher, N., Lampert-Karako, S., Yaron, O., et al. (2021) Chromatin dynamics and gene expression response to heat exposure in fieldconditioned versus laboratory-cultured *Nematostella vectensis*, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7454, doi: 10.3390/ ijms22147454.
- 168. Weizman, E., and Levy, O. (2019) The role of chromatin dynamics under global warming response in the symbiotic coral model *Aiptasia*, *Commun. Biol.*, **2**, 282, doi: 10.1038/ s42003-019-0543-y.
- 169. Murad, R., Macias-Muñoz, A., Wong, A., Ma, X., and Mortazavi, A. (2021) Coordinated gene expression and chromatin regulation during hydra head regeneration, *Genome Biol. Evol.*, **13**, doi: 10.1093/gbe/evab221.
- 170. Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., et al. (2007) Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing, *Nat. Methods*, **4**, 651-657, doi: 10.1038/nmeth1068.
- 171. Illumina. Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq), URL: https://www.illumina.com/techniques/ sequencing/dna-sequencing/chip-seq.html, Accessed 25.10.2021.
- 172. Park, P. J. (2009) ChIP-seq: Advantages and challenges of a maturing technology, *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 669-680, doi: 10.1038/nrg2641.
- 173. Nakato, R., and Sakata, T. (2021) Methods for ChIP-seq analysis: a practical workflow and advanced applications, *Methods*, 187, 44-53, doi: 10.1016/j.ymeth.2020.03.005.
 174. Abcam plc. Histone modifications, URL: https://
- 174. Abcam plc. Histone modifications, URL: https:// www.abcam.com/epigenetics/histone-modifications, Accessed 03.12.2021.
- 175. Cell Signaling Technology, I. Histone Modification Table, URL: https://www.cellsignal.com/learn-and-support/

reference-tables/histone-modification-table, Accessed 03.12.2021.

- 176. Reddy, P. C., Gungi, A., Ubhe, S., and Galande, S. (2020) Epigenomic landscape of enhancer elements during Hydra head organizer formation, Epigenet. Chromatin, 13, 43, doi: 10.1186/s13072-020-00364-6.
- 177. Schwaiger, M., Schonauer, A., Rendeiro, A. F., Pribitzer, C., Schauer, A., et al. (2014) Evolutionary conservation of the eumetazoan gene regulatory landscape, Genome Res., 24, 639-650, doi: 10.1101/gr.162529.113.
- 178. Sebe-Pedros, A., Saudemont, B., Chomsky, E., Plessier, F., Mailhe, M. P., et al. (2018) Cnidarian cell type diversity and regulation revealed by whole-organism single-cell RNA-Seq, *Cell*, **173**, 1520-1534.e1520, doi: 10.1016/j.cell. 2018.05.019.
- 179. Jaitin, D. A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., et al. (2014) Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types, Science, 343, 776-779, doi: 10.1126/science. 1247651.
- Keren-Shaul, H., Kenigsberg, E., Jaitin, D. A., David, E., Paul, F., et al. (2019) MARS-seq2.0: An experimental and analytical pipeline for indexed sorting combined with sin-gle-cell RNA sequencing, *Nat. Protoc.*, **14**, 1841-1862, doi: 10.1038/s41596-019-0164-4.
- 181. Siebert, S., Farrell, J. A., Cazet, J. F., Abeykoon, Y., Primack, A. S., et al. (2019) Stem cell differentiation trajectories in Hydra resolved at single-cell resolution, Science, 365, eaav9314, doi: 10.1126/science.aav9314.
- 182. Macosko, E. Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., et al. (2015) Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter dramater. *Cell*, 161, 1202 1214. doi:10.1016/j.col15015 droplets, Cell, 161, 1202-1214, doi: 10.1016/j.cell.2015. 05.002.
- 183. Bageritz, J., and Raddi, G. (2019) Single-Cell RNA Sequencing with Drop-Seq. in Single Cell Methods:

Sequencing and Proteomics (Proserpio, V. ed.) Springer

- New York, New York, pp. 73-85.
 184. Hu, M., Zheng, X., Fan, C. M., and Zheng, Y. (2020) Lineage dynamics of the endosymbiotic cell type in the soft coral Xenia, Nature, 582, 534-538, doi: 10.1038/s41586-020-2385-7
- 185. Qiu, X., Mao, Q., Tang, Y., Wang, L., Chawla, R., et al. (2017) Reversed graph embedding resolves complex singlecell trajectories, Nat. Methods, 14, 979-982, doi: 10.1038/ nmeth.4402.
- 186. La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., et al. (2018) RNA velocity of single cells, *Nature*, **560**, 494-498, doi: 10.1038/s41586-018-0414-6.
 187. Chari, T., Weissbourd, B., Gehring, J., Ferraioli, A., Leclère, L., et al. (2021) Whole animal multiplexed single-cell trace.
- cell RNA-Seq reveals plasticity of *Clytia* medusa cell types, bioRxiv, doi: 10.1101/2021.01.22.427844.
- 188. Lapebie, P., Ruggiero, A., Barreau, C., Chevalier, S., Chang, P., et al. (2014) Differential responses to Wnt and PCP disruption predict expression and developmental function of conserved and novel genes in a cnidarian, *PLoS Genet.*, **10**, e1004590, doi: 10.1371/journal.pgen.1004590.
- 189. Marlow, H., Roettinger, E., Boekhout, M., and Martindale, M. Q. (2012) Functional roles of Notch signaling in the cnidarian Nematostella vectensis, Dev. Biol.,
- 362, 295-308, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.11.012.
 190. Matus, D. Q., Thomsen, G. H., and Martindale, M. Q. (2006) Dorso/ventral genes are asymmetrically expressed and involved in germ-layer demarcation during cnidarian gastrulation, Curr. Biol., 16, 499-505, doi: 10.1016/j.cub. 2006.01.052
- 191. Suryawanshi, A., Schaefer, K., Holz, O., Apel, D., Lange, E., et al. (2020) What lies beneath: *Hydra* provides cnidarian perspectives into the evolution of FGFR docking proteins, Dev. Genes Evol., 230, 227-238, doi: 10.1007/ s00427-020-00659-4.

STUDYING OF MOLECULAR REGULATION OF DEVELOPMENTAL PROCESSES OF LOWER METAZOANS EXEMPLIFIED BY Cnidaria USING HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING

Review

T. V. Erofeeva^{1,2}, A. P. Grigorenko^{1,2*}, F. E. Gusev^{1,2}, I. A. Kosevich^{1,3}, and E. I. Rogaev^{1,2,3,4}

¹ Department Research Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, 354349 Sochi, Krasnodar Region, Russia; e-mail: anast1998@mail.ru

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Shrewsbury, MA 01545, USA

A unique set of features and characteristics of species of the Cnidaria phylum is the one reason that makes them a model for a various studies. The plasticity of a life cycle and the processes of cell differentiation and development of an integral multicellular organism associated with it are of a specific scientific interest. A new stage of development of molecular genetic methods, including methods for deep genome, transcriptome, and epigenome sequencing, both at the level of the whole organism and at the level of individual cells, makes it possible to obtain a detailed picture of the development of these animals. This review examines some modern approaches and advances in the reconstruction of the processes of ontogenesis of Cnidaria by studying the regulatory signal transduction pathways and their interactions.

Keywords: Cnidaria, development, sequencing technologies, genomics, signaling pathways

УДК 57.075

ГЕНОМИКА ДРЕВНИХ ПАТОГЕНОВ: ПЕРВЫЕ УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Обзор

© 2022 А.Б. Малярчук^{1*}, Т.В. Андреева^{1,2}, И.Л. Кузнецова^{2,3}, С.С. Кунижева^{2,3}, М.С. Протасова², Л.И. Уральский^{2,3}, Т.В. Тяжелова², Ф.Е. Гусев², А.Д. Манахов^{2,3}, Е.И. Рогаев^{2,3,4*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики, Центр генетики и генетических технологий, 119234 Москва, Россия;

электронная почта: a_malyarchuk98@mail.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия; электронная noчта: rogaev@vigg.ru

³ Университет Сириус, Центр генетики и наук о жизни, 354340 Сочи, Россия

⁴ Медицинская школа Чан Массачусетского университета, Департамент психиатрии, 01545 Шрусбери, США

Поступила в редакцию 14.12.2021 После доработки 08.01.2022 Принята к публикации 21.01.2022

Развитие палеогеномных исследований — одно из актуальных и перспективных направлений междисциплинарных исследований в современной мировой науке. Новые геномные методы анализа древней ДНК (дДНК), такие как технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяют не только получать подробную генетическую информацию об исторических и доисторических популяциях человека, но и изучать отдельные микробные и вирусные патогены и микробиомы из разных древних и исторических объектов. Исследования дДНК патогенов путём реконструкции их геномов позволили к настоящему времени получить полные последовательности древних геномов для патогенов, сыгравших значительную роль в истории человечества: Yersinia pestis (возбудитель чумы), Variola virus (оспа), Vibrio cholerae (холера), HBV (вирус гепатита B), а также не менее важных эндемичных инфекционных агентов человека Mycobacterium tuberculosis (туберкулёз), Mycobacterium leprae (проказа) и Тreponema pallidum (сифилис). Геномные данные этих патогенов дополнили сведения, полученные ранее палеопатологами, и позволили не только идентифицировать возбудителей пандемий прошлого, но и выявить ныне несуществующие линии патогенов, уточнить хронологию появления патогенов в популяциях человека, а также реконструировать эволюционную историю патогенных микроорганизмов, которые остаются актуальными для общественного здравоохранения сегодня. В настоящем обзоре описывается современное состояние геномных исследований происхождения и эволюции многих древних патогенных микроорганизмов и вирусов, а также рассматриваются механизмы возникновения и распространения древних инфекций в истории человечества.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: популяции человека, древняя ДНК, палеопатология, палеогеномика, патоген, чума, холера, лепра, сифилис, оспа, туберкулёз.

DOI: 10.31857/S0320972522020087

введение

В последние десятилетия значительно возросли технические возможности в области секвенирования древней ДНК (дДНК), в том числе древних патогенов. Появляются всё более совершенные методы подготовки геномных биб-

* Адресат для корреспонденции.

лиотек, обогащения ДНК, секвенирования; развиваются и инструменты для биоинформатического анализа геномных данных. Растёт число работ, посвящённых идентификации и характеристике на молекулярно-генетическом уровне патогенных микроорганизмов, извлечённых из древних останков. Таким образом, появилась новая область исследований — молекулярная палеоэпидемиология [1], в задачи которой входит исследование вопросов возникновения инфекций и распространения патогенов в популяциях человека.

Долгое время изучение перенесённых инфекционных заболеваний проводилось тради-

Принятые сокращения: дДНК – древняя ДНК; СРХV – вирус коровьей оспы; NGS – высокопроизводительное секвенирование; TIR – инвертированные концевые повторы; VARV – вирус натуральной оспы человека; VACV – вакцинный вирус оспы.

ционным путём палеопатологической оценки костей древних скелетов из археологических раскопок, однако этот подход имеет существенные ограничения, связанные с тем, что многие инфекции не оставляют видимых следов на костях, а другой материал оказывается недоступен для исследования [2].

Первые успехи в изучении ДНК древних бактерий и вирусов стали возможны с появлением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот подход позволяет обнаружить присутствие инфекционных агентов, но даёт ограниченную информацию об эволюционной истории патогена, поскольку генетический материал микроорганизмов в таком случае анализируется по одному или нескольким коротким фрагментам, амплифицированным из препаратов ДНК, выделенных из останков древних людей [3, 4]. Кроме того, дДНК, извлечённая из археологического материала, обычно присутствует в нём в небольших количествах, сильно фрагментирована и содержит химические модификации [5, 6], что затрудняет амплификацию.

С развитием методов высокопроизводительного секвенирования (NGS) в большом количестве стали появляться последовательности полных геномов современных организмов, включая микробы и вирусы. Таким образом, выросло количество референсных геномных последовательностей, включая отдельные штаммы. Для палеогенетических исследований такой прорыв позволил не только однозначно констатировать наличие инфекционного возбудителя в суммарной ДНК, выделенной из древнего образца, но и более точно определить филогению выделенного штамма. Первой удачной попыткой собрать полный геном древнего патогена стал геном известного бактериального возбудителя чумы Yersinia pestis, опубликованный в 2011 г., за которым последовало множество работ по геномным исследованиям различных патогенов.

К настоящему времени наибольшее количество геномных данных получено для Y. pestis (возбудитель чумы), Variola virus (оспа), Vibrio cholerae (холера), а также трёх не менее важных эндемичных инфекционных агентов человека – Mycobacterium tuberculosis (туберкулёз), Mycobacterium leprae (проказа) и Treponema pallidum (сифилис).

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ПАЛЕОГЕНЕТИКИ

При работе с дДНК, в том числе микробного происхождения, извлечённой из исторических и археологических образцов, существует ряд проблем и ограничений, обусловленных её

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

специфическими особенностями. Археологические образцы обычно содержат смеси эндогенной (прижизненной) и экзогенной (посмертной) микробной ДНК, которая может включать комменсальные бактерии (например, микробные колонии в зубном камне), эпидемические патогены (например, Y. pestis в пульповой полости зубов) и бактерии окружающей среды (например, почвенные микроорганизмы, участвующие в разложении). Кроме того, загрязнение дДНК в образце может возникнуть на всём протяжении анализа - с момента археологических раскопок и обработки древнего материала при контакте с исследователями (например, кожные микробы), при нарушении условий хранения (например, чрезмерный рост бактерий и грибов), а также от лабораторных источников загрязнения, таких как реагенты (например, ДНК-полимеразы и другие ферменты, буферы, загрязнённые бактериальной ДНК) [7]. Целевая составляющая выделенной дДНК насчитывает в среднем 1-10%, при этом на фракцию патогена, которую можно выделить, приходится менее 0,5% от общего метагенома. Исключение составляют образцы, полученные из вечной мерзлоты, либо препараты ДНК, выделенные из слуховых косточек. Поэтому важной задачей при исследовании древних патогенов и других микроорганизмов является подтверждение аутентичности полученных результатов, т.е. доказательство того, что выделенная ДНК принадлежит древнему образцу (бактерии или вирусу), а не является результатом контаминации. Следовательно, анализ дДНК и проверка полученных результатов требуют строгого соблюдения определённых методологических стандартов.

К настоящему времени древняя микробная ДНК была успешно выделена из различных типов образцов — костей, зубов, копролитов, музейных образцов, кальцинированного зубного налета, почвы и т.д. (таблица).

Однако основным объектом для извлечения ДНК древних патогенов пока остаются костные останки человека. Современные методологические подходы к выделению дДНК и подготовке её для проведения геномного секвенирования методом масштабного параллельного секвенирования на платформе «Illumina» представлены в обзоре [8]. В данном разделе мы ограничимся примерами специальных методов, которые используются для оценки и подтверждения подлинности ДНК древних патогенов (процессу идентификации таксономии, проверки и аутентификации древних микробов с использованием данных высокопроизводительного секвенирования ДНК).

МАЛЯРЧУК и др.

Образец	Патоген				
Кости	Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Brucella melitensis, Brucella abortus, Treponema pallidum				
Зубы (пульпа)	различные патогены, передающиеся через кровь человека				
Зубы (зубной камень)	бактерии микробиома полости рта (Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis и др.)				
Кальцинированные включения в легких	M. tuberculosis				
Мумифицированные останки	различные патогены и различные комменсальные бактерии микробиома человека				
Копролиты	источник кишечной микробиоты человека				
Музейные медицинские образцы органов, залитые в парафин	Bacillus anthracis, Vibrio cholerae, Variola virus (VARV)				
Янтарь	грамотрицательные протеобактерии Brevundimonas				
Образцы ископаемого льда и вечной мерзлоты	палеовирусы, например, Pithovirus sibericum				

Источники бактериальной древней ДНК и примеры микроорганизмов и патогенов, которые были выделены и охарактеризованы

Проверка таксономии древних патогенов и микроорганизмов. Традиционные методы определения таксономической принадлежности, такие как характеристика гомологий методом ДНК–ДНК-реассоциации, для которой необходимо изолировать и культивировать отдельные микроорганизмы, не могут применяться при исследовании древних бактерий. Поэтому на начальных этапах использовался генетический анализ древних патогенов методом ПЦР с использованием праймеров, специфичных для маркёрных генов возбудителей инфекционных заболеваний, как, например, гена *гроВ* (возбудителя чумы Y. Pestis) [3, 4]. Основная сложность в интерпретации результатов ПЦР – присутствие в древних образцах смеси бактериальных организмов, что может привести к неспецифическим или даже ложноположительным результатам, как, например, в случае с ДНК почвенных бактерий, содержащих последовательности, высокогомологичные ДНК M. tuberculosis и Y. pestis [9, 10].

Другой метод идентификации микроорганизмов, получивший наиболее широкое распространение, основан на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК [11]. Так как последовательность гена 16S рРНК сходна у разных таксонов микробов, для его ПЦР-амплификации используют универсальные праймеры. Анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК позволяет с высокой степенью достоверности определять как филогенетическое положение микроорганизмов, так и надёжно идентифицировать их на родовом, а иногда и на видовом уровнях. Возможность быстро и недорого секвенировать десятки или сотни тысяч целевых гипервариабельных последовательностей гена 16S рРНК одновременно с использованием методов секвенирования нового поколения была успешно применена в крупном проекте «Human Microbiome Project» [12]. Этот подход также применялся в исследованиях дДНК, например, для определения таксономии ДНК, полученной из смеси костных останков, принадлежащих различным видам животных [13]. Однако этот метод не может быть напрямую применён к исследованиям древних бактерий, т.к. целевые гипервариабельные области гена 16S рРНК превышают среднюю длину получаемых фрагментов молекулы бактериальной дДНК.

В настоящее время при изучении таксономии метагеномных данных используют биоинформатические подходы, ориентированные на сопоставление считываний с последовательностями генов 16S pPHK (например, QIIME [14] и Mothur [15]) или с панелями однокопийных генов (например, MetaPhlAn2 [16, 17], MIDAS [18] и PhyloSift [19]), сопоставление всего генома на основе k-меров (например, Kraken [20] и CLARK [21, 22]), а также метод с гибридным сопоставлением на основе k-меров с расширением выравнивания (MALT [23, 24]). Целевая амплификация гена 16S pPHK популярна для профи-
лирования сложных микробных сообществ, а такие программы, как QIIME и Mothur, помогают обрабатывать данные ампликонов, проводить сортировку и таксономическое профилирование на основе больших баз данных генов 16S pPHK, таких как Greengenes [25]. DADA2 [26] и Deblur [27] – новые методы сортировки прочтений гена 16S рРНК, которые были внедрены в QIIME v2.0 и обеспечивают более точную группировку прочтений, чем методы, представленные в QIIME v1. Эти программы требуют нескольких копий каждой последовательности, которые, хотя и являются обычными в наборах данных ампликонов гена 16S рРНК, вряд ли могут иметь место в наборе древних прочтений, которые выбираются из набора метагеномных данных, полученных методом shotgun-секвенирования, из-за недостаточного покрытия. В исследовании Velsko et al. [28] было показано, что целевая амплификация гена 16S рРНК из сильно фрагментированных древних образцов ДНК может приводить к таксономическим ошибкам из-за длинных гипервариабельных областей и полиморфизмов длины [29], а ген 16S рРНК трудно собрать из метагеномов из-за его высококонсервативных областей [30].

Одно из основных различий между разными программами заключается в способе вычисления относительной численности. Используя набор однокопийных маркёрных генов, MetaPhlAn2 и MIDAS пытаются представить долю клеток каждого вида, обнаруженных в образце. Это отличается от методов на основе k-меров, таких как CLARK-S и MALT, которые сообщают о доле общей ДНК, отнесённой к каждому виду. Размер генома может существенно различаться между видами бактерий, и виды с большими геномами могут казаться более многочисленными в образце, потому что большая доля ДНК принадлежит этим видам, даже если количество клеток мало. Относительное число видов, полученное с помощью методов идентификации на основе k-меров, может быть нормировано на предсказанный размер генома, чтобы приблизительно определить число копий клеток, даже если точный штамм неизвестен, поскольку размер генома в значительной степени совпадает в пределах вида. При рассмотрении метагеномных профилей сообществ следует иметь в виду различие между относительной численностью, сообщаемой метагеномными профилировщиками, нормирующими (MetaPhlAn2 и MIDAS) и ненормирующими (CLARK-S, MALT, OIIME) число копий клеток.

CLARK-S лучше всего подходит для получения наибольшего количества определённых прочтений или для выявления относительного содержания всех фрагментов ДНК (если, например, нужно попытаться собрать геном из всех прочтений, отнесённых к одному виду). Однако обнаружение настоящих видов с малой численностью (особенно вирусов и бактериофагов) с помощью CLARK-S невозможно из-за высокой частоты ложноположительных идентификаций с численностью менее 0,1%.

МАLТ уникален тем, что он может обеспечить функциональную классификацию прочтений, а также таксономическую классификацию, но он испытывает трудности с присвоением, когда используемая база данных содержит большое количество близкородственных видов. Кроме того, как и CLARK-S, MALT имеет высокий процент ложноположительных определений в малочисленных таксонах.

Наименее точный метод QIIME/UCLUST включает множество ложноположительных результатов даже при отсеивании таксонов с низкой численностью. Также результаты работы Velsko et al. [28] показывают, что это единственная программа, чья производительность заметно отличалась между древними и современными образцами.

Влияние моделей повреждения ДНК на таксономическое распределение варьируется в разных программах, но большинство протестированных программ [28] подвержены неправильному распределению только в небольшой части прочтений из-за повреждения ДНК. В целом, результаты показывают, что для видов с высокой численностью таксономические ошибки сходны между современными и древними смоделированными наборами метагеномных данных.

Повреждение ДНК по-разному влияет на частоту ложных срабатываний пяти протестированных программ, но смещение базы данных гораздо сильнее влияет на профилирование наиболее распространённых видов. CLARK-S, MetaPhlAn2, MIDAS и QIIME/UCLUST имеют большее количество ложноположительных определений в древних, чем в современных наборах данных, однако в MetaPhlAn2 эти различия не существенны. Это может быть проблемой при сравнении и сопоставлении микробных профилей древних и современных метагеномов, особенно для определения присутствия и распределения видов с низкой численностью. Если не учесть более высокий процент ложноположительных результатов в древних образцах по сравнению с современными, можно сделать неверный вывод о том, что многочисленные виды с низкой частотой встречаемости были утрачены в процессе эволюции. Поэтому очень желательно иметь одинаковые показатели ложноположительных результатов для древних и современных наборов данных, и такие программы, как MALT и MetaPhlAn2, больше подходят для этих целей, чем CLARK-S, MIDAS и QIIME/ UCLUST, поскольку показатели ложноположительных результатов в древних и современных образцах сопоставимы как до, так и после фильтрации.

Недавно Hübler et al. [31] разработали новый биоинформационный инструмент HOPS для эвристического скрининга патогенов на основе алгоритма mapDamage, который анализирует данные, полученные при помощи MALT, для идентификации и подтверждения подлинности бактериальных патогенов в древних метагеномных образцах и извлечения этой информации для дальнейшего анализа. В сочетании с гибридизационным захватом для получения большего числа последовательностей древних эукариот HOPS может позволить оценить подлинность дДНК на основе профилей повреждения ДНК, даже если доступно очень мало последовательностей (≤50 прочтений на вид).

Результаты выполнения HOPS можно визуализировать при помощи программы MaltExtract Interactive Plotting Application (MEx-IPA, автор J. Fellows Yates; https://github.com/jfy133/MEx-IPA) для визуализации профилей повреждения дДНК целевых таксонов.

Базы данных, используемые при анализе древних патогенов и микроорганизмов. В настоящее время доступно множество разнообразных баз данных, которые используются для метатаксономического анализа древних образцов. К ним относятся базы данных, ориентированные на один локус, такой как ген 16S pPHK, или другие гены, в которых представлены ортологи этих генов у всех видов микроорганизмов, содержащихся в базе данных. Существует несколько крупномасштабных общедоступных баз данных генов 16S pPHK, каждая из которых содержит миллионы выровненных эталонных последовательностей: например, Ribosomal Database Project (RDP) – http://rdp.cme.msu.edu (свыше 3 млн последовательностей), база данных Greengenes – https://greengenes.secondgenome. сот и проект SILVA – https://www.arb-silva.de (больше 2 млн последовательностей).

Кроме того, существуют базы данных, основанные на нескольких локусах, состоящих из небольшого набора генов домашнего хозяйства бактерий. Среди них, например, база данных MetaPhlAn36, которая содержит свыше миллиона уникальных маркёрных генов, отобранных для определения конкретных микробных клад (бактериальных, архейных и вирусных — более 17 000 референсных последовательностей генома, полученных из более чем 7000 таксонов на уровне видов). Третий вид баз данных — базы данных, содержащие полные геномы. Их преимущество заключается в том, что они позволяют идентифицировать известные микроорганизмы и патогены, присутствующие даже в небольших количествах в образце, так как любой секвенированный фрагмент ДНК определённого вида микроорганизма потенциально содержится в целевой базе данных. Следовательно, именно полногеномные базы данных могут быть наиболее полезны в исследованиях по обнаружению древних патогенов, когда в образце ожидается присутствие только следовых количеств ДНК патогенного организма. Ниже приводится перечень баз данных, доступных в настоящее время.

• Genomes OnLine Database (GOLD; https:// gold.jgi.doe.gov), DOE Joint Genome Institute, CША.

• NCBI Reference Sequence Database (RefSeq; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq), National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, CIIIA.

• NCBI GenBank Sequence Database (GenBank; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, CIIIA.

• Metagenome analyzer (MEGAN; https:// computomics.com/services/megan6.html), Center for Bioinformatics, Tübingen University, Германия.

• Microbial Database for Activated Sludge (MiDAS; https://www.midasfieldguide.org/global), Center for Microbial Communities, Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Дания.

• Virus Pathogen Resource (ViPR; https://www. viprbrc.org/), collaboration between the University of Chicago and J. Craig Venter Institute, CIIIA.

• Greengenes 16S rRNA gene database (Greengenes, https://greengenes.secondgenome.com), Center for Environmental Biotechnology, Lawrence Berkeley National Laboratory, California, CШA.

• Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID; http://gisaid.org).

• Virus-Host DB (https://www.genome.jp/ virushostdb/), Institute for Chemical Research, Kyoto University, Япония.

• Viral Bioinformatics Resource Center (VBRC; https://4virology.net/organisms/dsdna-viruses/ poxviridae/), University of Victoria, Канада.

• Nextstrain (https://nextstrain.org/), collaboration between researchers in Seattle, США и Basel, Швейцария.

Оценка повреждений ДНК. Так как дДНК сильно фрагментирована в результате процесса депуринизации с последующим гидролизом основной цепи ДНК, молекулы древней ДНК представляют собой короткие фрагменты, чаще

всего 30-60 п.н., этот признак можно использовать как один из маркёров для дифференциации древних последовательностей ДНК от контаминации современной ДНК, характеризующейся более длинными последовательностями. Присутствие дезаминирования цитозина, специфичных замен $C \rightarrow T$ и $G \rightarrow A$ в анализируемых фрагментах также может считаться признаком того, что это аутентичная дДНК [6]. Оценку предполагаемого уровня дезаминирования цитозина возможно провести при анализе результатов полногеномного секвенирования по профилю неправильного включения нуклеотидов (сдвиг нуклеотидного состава GC > TA), при сравнении секвенированной последовательности с референсным геномом, используемым при выравнивании последовательности. В настоящее время для более достоверной количественной оценки паттернов повреждений дДНК патогенов широко используются биоинформационные программы, такие как, например, mapDamage [32].

Оценка стойкости возбудителя. При оценке повреждений дДНК патогенов необходимо учитывать разное время сохранности различных микроорганизмов. Например, известно, что грамположительные бактерии, такие как возбудители туберкулёза и проказы (*M. tuberculosis* и *М. leprae*), имеют клеточную стенку в несколько раз толще, чем грамотрицательные, а присутствие определённых химических компонентов в их бактериальной стенке, служащих, вероятно, защитой от повреждающего действия воды, может играть ключевую роль в сохранности их ДНК. Это учитывается при оценке повреждений ДНК у этих патогенов, так, например, анализ древних геномов *M. leprae* показал снижение сигнала дезаминирования [33].

Моделирование источника древней ДНК микроорганизмов — один из инструментов для оценки аутентичности. Для анализа древних бактерий из таких источников, как зубной камень и палеофекалии, рекомендуется проведение оценки на биологическую достоверность состава микробиомного сообщества перед дальнейшим анализом. Например, в исследовании Warinner et al. [34] совокупность выделенной ДНК из образца зубного камня была смоделирована с помощью программного инструмента SourceTracker как смесь ДНК, происходящая из бактерий, образующих зубной налет, кожных бактерий, почвенных бактерий и др. Используя сравнение с референсными наборами современных метагеномных данных, выбранными для каждого из этих источников, алгоритм оценивал долю образца зубного камня, происходящего из каждого источника, перед дальнейшим анализом структуры и функций микробиома [34]. Авторы работы установили, что археологические образцы зубного камня, демонстрирующие плохие профили SourceTracker, не подходят для определения древнего микробиоценоза полости рта, так как он мог быть изменён в результате процессов разложения или загрязнения [34].

Обогащение геномных библиотек. Вслед за возросшей доступностью технологии массивного параллельного секвенирования ДНК были разработаны и методы обогащения библиотек ДНК для изучения древних микробов. Во многих случаях нет необходимости секвенировать весь геном патогена — иногда для целей исследования бывает достаточно получить последовательности нуклеотидов нескольких определенных локусов. В таких случаях проводят обогащение библиотек для секвенирования целевыми фрагментами ДНК с помощью гибридизации, используя в качестве зондов одноцепочечные последовательности ДНК или РНК с высокой гомологией (Hybridization capture). Таким способом был, например, идентифицирован древний штамм патогена Y. pestis, ответственный за вспышку первой эпидемии чумы (VI–VIII BB.) [35].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Лепра (проказа, болезнь Хансена) считается одной из старейших известных болезней человека, основным возбудителем которой является бактерия *M. leprae* (открытая в XIX в., она стала первым известным человечеству возбудителем болезни). Небольшое количество случаев наиболее тяжёлой формы проказы связано с Mycobacterium lepromatosis, бактерией из сестринского таксона [36]. Лепра – это хроническое заболевание, передающееся воздушно-капельным путём от человека к человеку, характерной особенностью болезни является поражение костей черепа (риномаксиллярный синдром) и деформации кистей и стоп. Сложность диагностики лепры в древних скелетных останках связана с тем, что идентичные изменения скелета могут быть вызваны другими заболеваниями, такими как сифилис или псориатический артрит [37]. Поскольку *M. leprae* является облигатным патогеном, его присутствие в останках древних людей считается явным доказательством инфекции [38].

Ранее на основе исторических и эпидемиологических данных был проведён анализ географического распространения проказы в древности, и было установлено, что вспышки проказы связаны с периодами глобализации, такими как эпоха Великого переселения народов или создание Римской империи, когда формировались обширные пространства, связанные с регулярными контактами населения различных территорий или торговыми путями [39–43]. В России проказа известна со времён Киевской Руси, о чём свидетельствуют палеопатологические исследования костных останков из погребений X в. на территории Киева, который находился на пересечении Великого шёлкового пути в Европе и входил в зону риска распространения проказы в древности [44].

Впервые схема эволюции возбудителя проказы была предложена Monot et al. [45] на основе сравнительного генетического анализа большого количества современных образцов из разных географических мест. Исследование показало, что все ныне существующие случаи лепры можно отнести к одному клону, было определено четыре основных штамма *M. leprae*, на основании распространения которых была предложена гипотеза о возникновении заболевания в Восточной Африке или на Ближнем Востоке и о его последующем распространении в процессе миграций людей. Европейцы или выходцы из Северной Африки занесли проказу в Западную Африку и Америку в течение последних 500 лет. Дополнительные исследования с использованием в том числе генетических данных бактерии *М. leprae*, выделенной из древних останков (возраст которых 1500 лет) больного проказой из Египта, увеличили количество сохранившихся до наших дней разновидностей *M. leprae* до шестнадцати [46].

С целью анализа генетического разнообразия и популяционной структуры *M. leprae* в исследовании Schuenemann et al. [47] были получены геномы десяти штаммов *M. leprae* из костных останков больных проказой из различных регионов средневековой Европы (Италии, Венгрии, Чехии, Великобритании и Дании), датируемых IV–XIV вв. Филогения, реконструированная на основе всех опубликованных средневековых и современных геномов, продемонстрировала высокое разнообразие штаммов *М. leprae* в средневековой Европе, относящихся к четырём основным филогенетическим ветвям *M. leprae*, включая самые базальные из них, редко обнаруживаемые где бы то ни было [47]. Было также показано, что два древних штамма М. leprae и 52 современных штамма из США являются филогенетически близкими, что может свидетельствовать о том, что Европа являлась ключевым регионом для раннего распространения проказы [48–50].

В работе Fotakis et al. [48] на примере норвежского индивида XVI в. была впервые продемонстрирована возможность успешного выделения ДНК и реконструкции генома *M. leprae* из зубного камня для дальнейшего полногеномного секвенирования на платформе «Illumina» в режиме одноконцевых прочтений. Авторы получили дДНК *M. leprae*, где 76% генома было представлено с 5-кратным покрытием. Филогенетический анализ с использованием 164 ранее опубликованных древних и современных геномов *М. leprae* показал выраженное генетическое сходство полученного древнего норвежского генома *M. leprae* с геномами других современных и древних штаммов из Северной Европы. Таким образом, было показано, что зубной камень человека может служить альтернативным материалом для обнаружения и геномного анализа М. leprae в древних скелетных останках вместо использования материала из костей и зубов, что особенно актуально в случае невозможности диагностики данного заболевания палеопатологическими методами.

Вопрос о происхождении лепры на островах Тихого океана является спорным. Считалось, что проказа была завезена на острова европейцами во время колонизации в XIX в., но некоторые палеопатологические данные предполагают более раннее распространение болезни [51]. Результаты недавнего исследования девяти геномов *М. leprae* с островов Тихого океана [52] позволяют предположить, что бактерия могла быть завезена в Океанию во время первых миграций человека около 3000 лет назад с повторной интродукцией во время последующих миграций, что подтверждает гипотезу о более раннем занесении лепры в Тихоокеанский регион [53].

Культура изоляции людей, больных проказой, и, соответственно, организация отдельных захоронений при лепрозориях дала возможность проведения уникального сравнительного генетического анализа останков людей, заражённых лепрой с останками из обычных захоронений из той же местности и того же периода. Например, был проведён популяционный анализ индивидов из кладбища лепрозория St. Jørgen (Дания, XIII-XVI вв.), в котором были исследованы гены, связанные с иммунным статусом. Были показаны значимые ассоциации аллеля лейкоцитарного антигена человека DRB1*15:01 сочетание гаплотипов И DRB1*15:01 и DOB1*06:02 с заболеванием лепроматозной проказой в средневековых популяциях [54]. В современных популяциях аллель DRB1*15:01 также является фактором восприимчивости к проказе. Интересно, что комбинация аллелей DRB1*15:01-DQB1*06:02 представляет собой гаплотип, широко распространенный у современных европейцев [55, 56], который является генетическим фактором риска развития язвенного колита, саркоидоза и рассеянного склероза [57–59], в то же время он защищает от диабета 1-го типа [60].

Эти различные ассоциации заболеваний подчёркивают хорошо известную плейотропию вариантов HLA, которые влияют на популяционную частоту определённых гаплотипов и вносят вклад в генетическое разнообразие в области HLA в целом. В более общем плане эти результаты предоставляют новые доказательства гипотезы о том, что древние эпидемии, например, такие как проказа, повлияли на частоту аллелей генов, связанных с воспалительными заболеваниями в современных популяциях [61-63]. В перспективе реконструкция того, как люди адаптировались к крупным эпидемиям в прошлом, поможет понять генетические факторы, участвующие в нашей нынешней предрасположенности к инфекционным заболеваниям.

Холера — острое заболевание, вызываемое грамотрицательными бактериями *V. cholerae*, колонизирующими тонкий кишечник и вырабатывающими холерный токсин [64]. До начала XIX в. холера была эндемична в Азии, но в 1817 г. глобализация привела к распространению заболевания из Индии в другие регионы и возникновению первой пандемии. Всего в XIX—XX вв. было 6 волн эпидемии, седьмая началась в конце XX в. и продолжается до сих пор; случаи холеры регистрируются в эндемичных районах Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки [65]. Причиной всех волн эпидемии является загрязнённая вода.

К настоящему времени проведены лишь единичные геномные исследования холерных вибрионов из палеообразцов. Так, в 2014 г. группа исследователей с использованием методов NGS реконструировала геном V. cholerae из coxранённого желудка жертвы второй пандемии холеры (вспышки в Филадельфии в 1849 г.). Было показано, что этот штамм гомологичен на 95-97% референсному штамму классического биовара холеры О395, отличаясь от него 203 однонуклеотидными заменами, отсутствием трёх геномных локусов и наличием тандемных повторов профага, содержащего ген холерного токсина, потенциально влияющих на вирулентность [66]. Выявление холерного вибриона в археологических образцах затруднено тем, что в наиболее удобном материале для выделения ДНК – костной ткани и зубной эмали, по-видимому, невозможно обнаружить ДНК данного вибриона. Однако при исследовании останков «холерного» кладбища времен пятой волны эпидемии холеры в Аргентине наличие холерного

8 БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

вибриона в одном из образцов седиментов крестцовых отверстий удалось выявить методом ПЦР и секвенирования по Сэнгеру [67]. На сегодняшний день это единственный случай обнаружения дДНК *V. cholerae*, что подтверждает расширение возможностей обнаружения патогенов в археологических образцах при включении в анализ образцов седиментов.

Туберкулёз. Ещё одно заболевание, поражающее людей на протяжении тысячелетий и являющееся самым смертельным из бактериальных инфекций – это туберкулёз, вызываемый бактерией *M. tuberculosis* [68]. Несмотря на то что геном палочки Коха активно изучается, единого мнения о происхождении болезни и времени её появления до сих пор нет [69]. Выявление патогена в древних останках обычно производится с помощью метода ПЦР с использованием праймеров на гены пероксидазы, каталазы (katG) и фосфолипазы С (mpt40), которые обнаружены исключительно бактерий v *M. tuberculosis complex* (хотя *mpt40* отсутствует у *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* и, возможно, в некоторых других штаммах туберкулёза), и, следовательно, используются в качестве специфических маркёров наличия ДНК M. tuberculosis [70].

На основе молекулярных исследований современных геномов бактерии M. tuberculosis была выдвинута гипотеза, предполагающая, что самый недавний общий предок M. tuberculosis следовал вместе с людьми во время миграций из Африки на протяжении примерно 70 000 лет. В то же время исследования с использованием древних геномов в качестве точек калибровки дают гораздо более молодой возраст общего предка — менее 6000 лет [70, 71]. Например, результаты байесовского филогенетического анализа недавно реконструированного генома M. tuberculosis из останков шведского епископа XVII в. Педера Винструпа (на сегодняшний день — это бактериальный геном с самым высоким покрытием (141-кратным) и самого высокого качества), пять ранее опубликованных древних и 255 современных геномов этого возбудителя свидетельствуют о появлении комплекса *M. tuberculosis* в неолите [72].

Штаммы *M. tuberculosis* из человеческих останков тысячелетнего возраста с территории прибрежного Перу оказались наиболее близки к штаммам *Mycobacterium pinnipedii*, поражающим тюленей и морских львов [70]. Авторами высказано предположение, что ластоногие могли переносить микобактерию от неизвестного видахозяина с берегов Африки к побережью Перу, где добыча мяса и меха морского зверя способствовала передаче бактерий людям [73]. Также существуют палеопатологические свидетельства наличия туберкулёзных поражений в человеческих останках с островов Тихого океана, которые могли появиться ещё до контакта с европейцами [74].

Недавнее открытие того, что гомозиготы по полиморфизму ТҮК2 Р1104А подвержены более высокому риску развития клинических форм туберкулёза, стало первым доказательством моногенной предрасположенности к туберкулёзу, тем самым дав нам уникальную возможность изучать совместную эволюцию человека и смертельного патогена *M. tuberculosis* [75]. С использованием методов байесовского анализа на большом наборе данных (1013 древних человеческих геномов, принадлежащих к семи историческим эпохам) было показано, что современный вариант Р1104А произошел от варианта общих предков жителей Западной Евразии около 30 000 лет назад [76]. Кроме того, было выявлено заметное колебание частоты Р1104А в течение последних 10 000 лет европейской истории после крупномасштабных миграций анатолийских неолитических фермеров и евразийских степных пастухов в Европу. Также результатом анализа стало обнаружение резкого уменьшения частоты полиморфизма после бронзового века, что может быть связано с сильным отрицательным отбором, начавшимся около 2000 лет назад, с относительным снижением приспособленности гомозигот на 20%, такой показатель является одним из самых высоких в геноме человека.

Таким образом, источники появления и распространения туберкулёза в популяциях человека остаются не до конца изученными, поэтому дальнейшие исследования, в том числе с помощью методов палеогенетики, являются весьма актуальными.

Сифилис – это древнее инфекционное заболевание, вызываемое спирохетой *T. pallidum* (бледная трепонема). Эпидемия этой болезни разразилась в Европе в конце XV в., и с тех пор вспышки сифилиса периодически возникают в разных частях мира (с миллионами заболевших каждый год), даже несмотря на открытие антибиотиков. Вопрос происхождения сифилиса остаётся спорным, выдвигались две основные гипотезы: «колумбовая» (американская) и «доколумбовая» (европейская). Ещё одна гипотеза предполагает общее доколумбовое происхождения сифилиса и других патологий, вызванных бактериями рода *Treponema* [77].

Согласно американской гипотезе, сифилис возник в Новом Свете и был завезён в Европу экипажем первой американской экспедиции, так как время вспышки этой болезни совпадает

с возвращением Колумба. Быстрое распространение заболевания среди европейцев при этом объясняют отсутствием у них иммунитета к новой болезни.

Вторая гипотеза, называемая «доколумбовой», предполагает, что сифилис присутствовал у населения Старого Света ещё до контакта с Америкой, и болезнь могла распространиться в Евразии и Африке ещё в доисторические времена [78]. Согласно этой версии, сифилис в древних европейских образцах мог быть не диагностирован из-за сходства симптомов с другими патологиями, например с лепрой [79], или болезнь могла стать более вирулентной, а её течение более тяжёлым только в XV в., начав быстро распространяться в том числе из-за социальных факторов.

Третья гипотеза возникновения сифилиса является разновидностью «доколумбовой» гипотезы и предполагает, что все трепонематозы (сифилис, фрамбезия, пинта, беджель) являются одним заболеванием, проявляющимся в разных формах в зависимости от климата и других условий. Однако в настоящее время пока нет достоверных подтверждений этой гипотезы, хотя высказаны предположения о возможных рекомбинационных событиях между разными штаммами трепонем [80].

ДНК бледной трепонемы была впервые выявлена в образцах ДНК из костей человека в 1999 г. [81] с помощью ПЦР, но более поздние попытки закончились неудачей [82]. Исследователи долгое время считали трепонему неподходящим объектом для палеогенетических исследований: спирохеты присутствуют в небольшом количестве в организме и даже при жизни пациентов их бывает сложно детектировать генетическими методами [83]. Филогенетические исследования, выполненные на материале от современных пациентов и образцах, собранных в 1912 г. и культивируемых в лабораторных условиях, позволили реконструировать эволюционную историю T. pallidum и обнаружить доминирующий кластер, всё разнообразие которого сформировалось в XX в. после открытия антибиотиков [84].

Возможность проведения полногеномных исследований стала прорывом в изучении сифилиса, поскольку короткие участки, амплифицированные с использованием ПЦР, не могли дать достаточной информации о медленно эволюционирующем патогене [77]. Исследования, основанные на методах NGS, были впервые успешно выполнены на трепонемах из костей приматов. После этого стало появляться всё больше и больше работ, связанных с извлечением ДНК трепонемы из археологических образцов. В 2018 г. был проведён первый сравнительный анализ полных геномов *Т. pallidum* из древних человеческих скелетов из колониальной Мексики XVII—XIX вв., в результате которого были получены данные, свидетельствующие о вероятных рекомбинационных событиях между разными подвидами трепонем [85].

Анализ последовательностей ДНК 25 костных образцов из Рио-де-Жанейро позволил выявить присутствие сифилиса в Бразилии времён колониального периода [86]. Также подтверждено с помощью молекулярных методов палеопатологическое предположение о случае сифилиса в 150-летних останках плода (29 недель) во Франции [87]. Недавнее исследование, показавшее более сложную, чем считалось ранее, картину географического распределения ранних эпидемий трепонем, было основано на реконструкции четырёх геномов T. pallidum из средневековой Европы (XIV-XVII вв.). Исследованные древние геномы свидетельствуют о генетическом разнообразии *T. pallidum*, существовавшем в Средние века в Старом Свете, в частности, было показано присутствие как трепонем, вызывающих сифилис, так и подвидов, связанных с другими типами трепонематозов. Однако эти результаты не опровергают гипотезы об интродукции новых штаммов трепонем из Нового Света участниками европейских экспедиций и потенциальных изменений в геномах в результате рекомбинационных событий между ними и европейскими трепонемами [80].

Чума. Yersinia pestis является возбудителем чумы – болезни, унесшей жизни около 60% населения Старого Света во время трёх разрушительных пандемий: первой, или юстиниановой чумы (VI–VIII вв.), второй, или Чёрной смерти (XIV–XVIII вв.), и третьей, или современной пандемии (XVIII–XIX вв.), начавшейся в Китае [88–90]. Сейчас чума считается проблемой прошлого, хотя до сих пор ежегодно регистрируются сотни случаев заболевания в африканских странах [91].

Подробное описание последних достижений в области генетических исследований *Y. pestis* и полученные с их помощью новые данные о наиболее известных эпидемиях чумы в истории человечества представлены в обзоре Кузнецовой с соавт. [92]. Наиболее важными, с точки зрения пополнения исторических фактов и изучения эволюции чумной палочки, были находки *Y. pestis* в останках, датированных бронзовым веком, т.е. намного ранее известных пандемий. Кроме того, по мере накопления геномных данных были установлены возможные причины окончания исторически известных пандемий.

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Как и в случае бактерий, гипотезы об эволюции вирусов высказывались только на основе данных о разнообразии современных штаммов. Накопление геномных данных из археологических образцов позволило сочетать в анализе древние и современные геномы. Так, исходя из эволюционного анализа штаммов вируса гепатита В, начиная с эпохи неолита, было высказано предположение о том, что данный вирус существует не менее 20 000 лет [93, 94]. Помимо изучения разнообразия штаммов вирусов во временном разрезе, ещё одним актуальным направлением изучения истории пандемий, вызванных вирусами, является анализ результатов медицинской защиты человека от заболеваний, в том числе вакцинации. Таким историческим примером служит борьба с вирусом оспы.

Оспа. Натуральная оспа является высокозаразным вирусным заболеванием, возбудителем которого является вирус оспы VARV, относящийся к семейству Poxviridae, роду Orthopoxvirus. Род Orthopoxvirus включает множество иммунологически родственных поксвирусов, которые сильно различаются по своей способности инфицировать разных хозяев. Вирус натуральной оспы VARV уникален среди других видов Orthopoxvirus тем, что является исключительно человеческим патогеном.

Патогенный вирус VARV существует в двух разновидностях: Variola major, вызывающий более тяжёлую клиническую форму болезни с летальностью 20-40%, а в некоторых эпидемиях – до 90%, и Variola minor, отличающийся низкой летальностью (1-3%) [95]. На протяжении многих столетий оспа, или как её называли в древности «Чёрная оспа», вызывала несколько крупномасштабных эпидемий, уровень смертности в которых доходил до 70% [96]. Так, уже в ХХ в. от оспы погибло свыше 300 млн человек [97]. В настоящее время натуральная оспа является единственной болезнью человека, которая была ликвидирована в мире в результате кампании всеобщей вакцинации к 1980 г., и это достижение остаётся одним из величайших триумфов современной медицинской науки [95]. Геном вируса натуральной оспы представляет собой линейную двухцепочечную ДНК, содержащую 186–187 т.п.н., с инвертированными концевыми повторами (TIR) на обоих концах последовательности. Локализация генов с различными функциями в геноме вируса натуральной оспы не случайна: центральная часть генома размером ~100 т.п.н. занята генами, которые являются общими с другими поксвирусами и кодируют ~100 белков, участвующих в первую очередь в

репликации и экспрессии вирусного генома, а также в морфогенезе вирионов [97, 98]. Вспомогательные гены, кодирующие белки, участвующие в различных аспектах взаимодействия вируса с человеком, группируются преимущественно в периферических областях генома, примыкающих к TIR-последовательностям. Эти вирусные белки отвечают за противодействие антивирусным ответам, включая такие, как врождённый иммунитет и запрограммированную гибель клеток, и играют основную роль в уклонении от иммунитета, патогенности и вирулентности вируса [99, 100] (рис. 1). В 2006 г. была составлена обширная база данных с полными геномными последовательностями современного вируса оспы VARV из ряда географически разделённых изолятов, собранных со всего мира [101]. Геномы всех секвенированных современных штаммов вируса VARV оказались очень сходны между собой, что объясняется медленными эволюционными изменениями в **ДНК** вирусов [102].

Сравнительный анализ геномов вируса VARV с геномами других поксвирусов (например, вируса коровьей оспы (CPXV), чьи предковые CPXV-подобные штаммы эволюционировали во все современные ортопоксвирусы) показал, что штаммы вируса натуральной оспы, в том числе наиболее вирулентные, после их расхождения от общего предка потеряли множество вспомогательных генов, что коррелирует с их узким (исключительно человеческим) кругом хозяев. Эти вирусные гены кодируют белки, содержащие домены межбелкового взаимодействия, участвующие в различных внутриклеточных и внеклеточных сигнальных путях, такие как белки кельх-домена (kelch), анкириновые белки поксвирусов (ANK), белки Bcl-2-домена и др. [103] (рис. 1).

Несмотря на то что вирус оспы активно изучается с помощью молекулярно-генетических методов, до сих пор остаются неизвестными временные рамки возникновения и распространения вируса VARV в популяциях человека. В последние десятилетия было предпринято несколько попыток реконструировать ДНК вируса натуральной оспы из археологических образцов: последовательности геномов древних



Рис. 1. Схема строения генома вируса оспы. Сокращения: ПЛК – палиндромная концевая область; КР – конкатемер; ТП – тандемные повторы; УНК – уникальная последовательность (без повторов). На рисунке представлены схемы строения геномов: вируса коровьей оспы (СРХV) [104], древнего вируса оспы (aVARV) из археологических останков, обнаруженных на севере Европы и датируемых эпохой викингов (600–1050 гг. н.з.) [105], современного вируса натуральной оспы (VARV) [103], вакцинного вируса оспы (VACV). На схеме обозначены вспомогательные вирусные гены, по которым различаются представленные геномы. Гены сортируются слева направо по категориям, в зависимости от функции (отмечены цветом), а затем – по их положению в геноме относительно друг друга. Жёлтым, синим и красным цветом обозначены гены, которые присутствуют и функционируют (в случае aVARV – предположительно функционируют); серым цветом обозначены гены, которые отсутствуют или инактивированы (в случае aVAR – это отсутствующие или предположительно инактивированные гены); частично окрашенные гены обозначают, что они функционируют/инактивированны у некоторых aVARV/VARV/VACV; белым цветом обозначены гены, информация для которых неизвестна в случае aVARV [105, 106]

вирусов оспы VARV были реконструированы из сибирских мумий XVII-XVIII вв., мумии ребёнка из Литвы, датированной XVII в., и из чешских музейных образцов XIX в. [107–109]. Древнюю ДНК патогена удалось выделить из мягких тканей мумии, для обогащения геномных библиотек была использована стратегия гибридизации с последующим массивным параллельным секвенированием на платформе «Illumina», а затем было проведено сравнение с референсным геномом современного образца вируса оспы VARV. В случае анализа древнего вируса из мумии ребёнка из Литвы, датированной XVII в., авторы также предприняли попытку сборки de novo генома древнего штамма VARV. Конечный геном de novo имел длину 187 565 п.н., а консенсусная последовательность de novo имела идентичность 97,5% по 185 578 п.н. с референсной последовательностью современного штамма VARV. Также был реконструирован геном вируса натуральной оспы из музейного образца XVIII в. в Англии, представляющего собой сохранённые в парафине ткани ребёнка, поражённые оспой. В данном случае выделенную ДНК использовали для создания библиотек и последующего полногеномного секвенирования на платформе «Illumina» без предварительного обогащения геномных библиотек. Филогенетический анализ древнего генома со всеми доступными современными и историческими геномами VARV продемонстрировал, что вирус XVIII в. относится к самостоятельной линии древних штаммов, отличной от геномов вируса XVII в., и занимает эволюционное положение между историческими образцами вирусов XVII в. из Литвы и современными европейскими штаммами XX в. [110]. На основе собранных данных ранее был сделан вывод о времени существования общего предка всех штаммов вируса натуральной оспы – между XIV и XVII вв. Однако исторические источники, упоминающие об оспе, такие как письменные свидетельства о возможных инфекциях оспы в Индии, датируются 1500 г. до н.э., а египетские мумии с кожными поражениями, сходными с оспой, датируются ещё раньше (3570 г. до н.э.) [111].

Результаты недавнего исследования 13 полногеномных последовательностей вируса натуральной оспы, выделенных из археологических останков, обнаруженных на севере Европы и датируемых эпохой викингов (600–1050 г. н.э.), сдвинули дату самого раннего случая заболевания натуральной оспой на тысячелетие и дали возможность говорить о присутствии вируса оспы в Европе уже в конце VI-начале VII в. [105]. Авторы провели сравнение геномных последовательностей древних вирусов и современных

штаммов VARV, в результате которого были обнаружены различия в количестве функциональных генов, относящихся к группе вспомогательных генов поксвирусов, отвечающих за противодействие антивирусным ответам. В последовательностях ряда генов были выявлены мутации (а именно: вставки, делеции или точечные замены, которые приводили к появлению стопкодонов либо сдвигу рамки считывания), которые приводят к инактивации гена. Оказалось, что по крайней мере 3 гена (CrmB, C1L и E5R), активные во всех образцах современных вирусов VARV, инактивированы у древних штаммов вирусов оспы, существовавших более 1000 лет назад.

В то же время 14 генов, инактивированных или отсутствующих у современных штаммов вируса VARV, предположительно были активны в некоторых или во всех образцах древнего вируса. Среди них обнаружилось 8 генов, которые кодируют различные факторы вирулентности, например, такие как C2L, F3L и A55R или, например, ген IL1B, кодирующий цитокин IL-1-бета семейства интерлейкина 1 (IL-1), участвующий в регуляции иммунных реакций и в воспалительных процессах [105] (рис. 1). Как уже упоминалось выше, потеря подобных генов ведёт к изменению вирулентности и приводит к ограничению круга «хозяев» поксвирусов [112]. Обнаруженные древние варианты вируса оспы эпохи викингов оказались частью ранее неизвестной, а ныне вымершей вирусной клады, которая эволюционировала независимо от современного VARV. Полученные данные подтверждают теорию редуктивной эволюции поксовирусов о том, что уменьшение количества генов предполагаемого предкового вируса играет решающую роль в видообразовании и приводит к тому, что любой вновь появляющийся вид вируса ограничивается определённой, только ему присущей экологической нишей (одним «хозяином») [105, 113].

Данные анализа геномов древних штаммов вируса натуральной оспы свидетельствуют о существовавшем высоком генетическом разнообразии вирусов оспы VARV в Европе до разработки противооспенной вакцины. Давление отбора со стороны возрастающего уровня вакцинации, вероятно, постепенно привело к исчезновению сразу нескольких древних линий вируса VARV, а доступные в настоящее время геномы вируса оспы VARV представляют лишь часть генетического разнообразия VARV в прошлом [108, 110].

Другим направлением в изучении древних штаммов вируса оспы является вопрос истории и эволюционных отношений различных штаммов противооспенной вакцины, который до сих пор остаётся неясным, так как нет достоверных данных о происхождении и разнообразии вирусов, используемых в программах ранней вакцинации. В конце XVIII в. первооткрыватель вакцины от оспы, Эдвард Дженнер, показал, что людей можно вакцинировать против заражения оспой, используя материал на основе вируса коровьей оспы (CPXV), что было намного безопаснее, чем существующая на тот момент практика «вариоляции» с помощью вируса оспы VARV [114]. Вирус коровьей оспы CPXV, в отличие от вируса натуральной оспы VARV, обладает наибольшим генетическим разнообразием и широким кругом хозяев и имеет весь набор генов, присутствующих во всех других ортопоксвирусах. Предполагают, что потеря генов сыграла важную роль в эволюции Orthopoxvirus и что предковые CPXV-подобные штаммы эволюционировали во все современные ортопоксвирусы в результате «редуктивной эволюции» [113]. Однако вирус осповакцины (VACV), который в конечном итоге был использован для искоренения оспы и который содержится во всех современных противооспенных вакцинах, отличается от любого известного современного штамма СРХУ. Биологическое происхождение VACV неизвестно, хотя было высказано предположение о том, что его предком мог быть вирус, похожий на вирус конской оспы, хотя геном современного вируса конской оспы (HPXV) несет в себе множество дополнительных генов [115]. Эта гипотеза подтверждается сообщением Jenner [114] о том, что он получил свою более позднюю инокуляцию от инфекции лошадей.

Геномный анализ вируса, ассоциированного с вакциной в исторических образцах, позволил получить данные об исторических вакцинных штаммах вируса оспы VACV, циркулирующих в Филадельфии в XIX в. во время активной вакцинации американских военнослужащих [116]. Авторы исследовали происхождение, разнообразие и распространение ранних штаммов противооспенной вакцины методом полногеномного анализа как вириона, так и метагенома, выделенных из исторических музейных «наборов» для вакцинации. Проведённый авторами филогенетический анализ помещает выделенные исторические вакцинные штаммы в кладу Orthopoxvirus (OPXV). Наиболее близкими к историческим вакцинным штаммам вируса оказались как современные североамериканские вакцинные штаммы VACV, так и различные штаммы вируса осповакцины, циркулирующие в природной среде обитания, включая южноамериканский крупный рогатый скот (Бразилия) и буйволов из Юго-Восточной Азии (Индия), а также вирус Cantagalo (CTGV), представляющий собой отдельный штамм коровьего вируса [116]. Ранее был проведён полногеномный анализ исторического штамма вируса осповакцины, выделенного из глицеринового образца, содержавшего противооспенную вакцину «Mulford» 1902 г. из Европы. В результате анализа было обнаружено, что геном этого штамма вируса осповакцины VACV на 99,7% совпадает с вирусом оспы лошади HPXV, что подтверждает предполагаемую роль вируса конской оспы в происхождении исторической противооспенной вакцины. Также авторы обнаружили у «Mulford» уникальные делеции на обоих концах последовательности размером 10,7 т.п.н. слева и 5,5 т.п.н. справа, примыкающие к области TIR-повторов, присутствующие в современных штаммах VACV, но отсутствующие в геноме вирусов конской оспы HPXV и коровьей оспы CPXV [117]. Таким образом, на основании данных исследований исторических штаммов осповакцины можно заключить, что для иммунизации европейского населения в XIX в. взаимозаменяемо использовались прививки, полученные как от коровьей, так и от конской оспы. Вероятно, что существовал и предковый вирус осповакцины (aVACV), который мог циркулировать в популяциях различных домашних животных (лошадей и коров) в Европе в XIX в., но затем исчез и теперь не имеет естественных хозяев, за исключением случаев заражения животных в отдельных странах, таких как Бразилия и Индия.

В настоящее время на основе полногеномного анализа современных и исторических вакцинных штаммов все существующие штаммы осповакцины разделены на 3 основных филогенетических кластера: евразийский кластер, включающий британский штамм Lister, китайский штамм Tian-tan и российский штамм Tashkent; южноамериканский кластер, включающий бразильские полевые штаммы осповакцины, представленные вирусом Cantagalo; и американский или Dryvax-кластер, который объединяет все вирусные клоны, выделенные из американской вакцины Dryvax [118]. Авторы показали, что центральная часть генома VACV оказалась высококонсервативна у всех вакцинных штаммов, а наибольшая часть основного генетического разнообразия (делеции и инверсии) находится в районе теломер. Обнаружено, что все современные штаммы осповакцины VACV характеризуются тремя генетическими особенностями: две делеции 10,7 и 5,5 т.п.н, расположенные в области повторов TIR на концах вирусной ДНК, а также мутация или делеция гена DVX 213, кодирующего анкириновый белок F-домена, гомолога гена B18R у вируса натуральной оспы (Бангладеш), потеря которого



Рис. 2. Схема-модель эволюции вируса осповакцины VACV, составленная на основе геномов современных штаммов осповакцины VACV и исторических штаммов осповакцины, полученных из разных источников. Показаны эволюционные процессы, которые привели к разнообразию штаммов вакцинных вирусов натуральной оспы VACV. Красным отмечены современные вакцинные штаммы, серым – исторические вакцинные штаммы; aVACV – пул из различных исторических предшественников всех современных вакцинных штаммов; HPXV – вирус конской оспы, гипотетический предшественник исторического вакцинного вируса; CPXV – вирус коровьей оспы, гипотетический предшественник исторического вакцинного вируса; пунктиром показан один из вероятных эволюционных процессов происхождения вируса конской оспы HPXV от вируса коровьей оспы CPXV

могла повлиять на вирулентность вируса VACV. Нужно отметить, что современные штаммы вируса осповакцины VACV не всегда группируются в простые филогенетические деревья, соответствующие известным историческим отношениям между этими штаммами. Скорее, можно предположить, что все существующие штаммы осповакцины VACV происходят из сложного набора различных вакцинных вирусов (пула вирусов), предшественников современного VACV, которые в течение продолжительного времени вакцинации в XIX–XX вв. были многократно пассированы, распределены и произвольно выбраны для создания штаммов современных вакцин (рис. 2).

Таким образом, можно заключить, что реконструкция геномов древних вирусов оспы с использованием технологий широкомасштабного геномного секвенирования существенно расширила наши представления об эволюции вируса натуральной оспы. Полученные новые данные о взаимосвязях между вирусом натуральной оспы человека и другими ортопоксвирусами, в том числе и вымершими древними штаммами вирусов человека и животных, изменили пред-

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

ставления об эволюционных взаимосвязях среди ортопоксвирусов (OPV) и улучшили понимание эволюционной истории натуральной оспы. Однако ещё остаются вопросы, связанные с происхождением вируса натуральной оспы, например, каким образом VARV эволюционировал в патоген, специфичный для человека, на которые должны ответить дальнейшие исследования.

БЛИЖАЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Длительная совместная эволюция человека и возбудителей инфекционных заболеваний привела к тому, что генетическая структура человеческих популяций изменялась под воздействием инфекционных агентов. Подобные изменения зачастую сопровождались отбором генетических вариантов в локусах, связанных с устойчивостью к конкретным инфекционным агентам, что уже было отмечено в первых работах, посвящённых одновременному анализу 50 и более образцов дДНК [119, 120]. Ожидается, что проведение исследований с использованием ранее неизученных древних образцов позволит выявить схожие эволюционные изменения в человеческих популяциях в ответ на воздействие инфекционных агентов.

Отдельный интерес представляют собой одномоментные коллективные захоронения, поскольку возможной причиной таких захоронений в некоторых случаях являлись вспышки инфекционных заболеваний. Метагеномный анализ ДНК из таких образцов потенциально может выявить патоген, ставший причиной смерти.

Параллельно с увеличением технических возможностей секвенирования развиваются и биоинформатические подходы. Большинство аналитических методов основано на сравнении с известными референсными последовательностями современных прокариот, которых на текущий момент получено почти 200 000 [121]. Тем не менее даже такое количество референсных последовательностей может быть проанализировано в течение нескольких часов и даже минут [122, 123]. Следует учитывать, однако, что геномные последовательности древних образцов могут иметь большую дивергированность по сравнению с современными образами, которая дополнительно отягощается химическими модификациями ДНК. Тем не менее эти методы успешно применяются и для анализа древних метагеномов [124]. Однако как для современных, так и для древних метагеномов могут применяться методы сборки de novo [125, 126] без использования референсных баз данных, что позволяет получить более точную последовательность генома. Кроме того, регулярно проводятся новые исследования: на сегодняшний день опубликовано уже более тысячи древних метагеномов [127]. Это позволит в будущем производить более широкий систематический анализ, а не только точечные исследования отдельных образцов.

Необходимо отметить основные технические сложности в исследованиях, связанных с палеогенетикой, которые предстоит решить в ближайшем будущем. Как правило, археологические образцы представлены останками в виде костей и зубов, однако многие известные патогены присутствуют в других тканях, которые не сохраняются с течением времени. На сегодняшний день есть успешные работы по выделению ДНК древних патогенов из мумифицированных тканей и исторических образцов, но они представляют собой единичные случаи. Ещё одним препятствием для получения полного генома древнего патогена является малое количество самого патогена в археологическом материале, что возможно решить путём увеличения числа «прочтений» при секвенировании. Так же, как отмечалось выше, важной проблемой для правильной интерпретации результатов секвенирования является сходство патогенных форм бактерий и непатогенных форм, представленных в почве в большом количестве. Одним из путей решения этой проблемы может являться анализ почвы и седиментов из коллективных захоронений. Работы, опубликованные за последние два года в области генетических исследований древних седиментов, демонстрируют их большой потенциал. Во-первых, в пробах из седиментов может содержаться ДНК, совпадающая с ДНК останков скелета [128], а также патогенов, населявших внутренние органы [67]. Во-вторых, появляется возможность анализировать ДНК окружающей среды исследуемого периода [129].

Молекулы РНК деградируют ещё быстрее, чем ДНК, тем самым накладывая ограничения на исследования эволюции патогенов с РНК-геномами (вирус гриппа, вирус кори, ВИЧ и вирус желтой лихорадки). Тем не менее недавние исследования показывают, что в благоприятных условиях РНК может сохраняться в течение тысячелетий [130, 131]. Секвенирование геномов древних РНК-вирусов кори и чумы крупного рогатого скота [132] является значимым событием, которое позволит нам лучше понять историю возникновения многих других патогенов на основе РНК. Интересно также, что фиксация формалином, губительная для ДНК, по-видимому, не оказывает такого влияния на РНК, а, наоборот, сохраняет её, как было показано в случае успешной реконструкции ВИЧ из архивных тканей [133].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, древняя ДНК является ценным материалом для углубления нашего понимания того, когда возникли и как распространялись и эволюционировали многие патогены. Мы можем видеть, что благодаря использованию молекулярно-генетических методов палеоэпидемиология развивается быстрыми темпами, а результаты новых работ зачастую опровергают старые гипотезы или находят подтверждения тем сценариям, которые считались маловероятными на основании классических подходов. Наши нынешние успехи были немыслимы ещё несколько десятилетий назад, и можно предположить, что дальнейший научный прогресс позволит получить ещё больше информации о происхождении и разнообразии древних патогенов.

Пандемия COVID-19 заставила ученых всего мира задуматься об истоках и причинах возникновения новых опасных инфекционных заболеваний, а также о поиске механизмов возможного перехода вирусных патогенов от вида к виду, в частности зоонозных вирусов к человеку. В свете этого одним из перспективных направлений в исследовании геномов древних патогенов является поиск и выделение ДНК и РНК палеовирусов и бактерий, сохранившихся в мягких тканях животных времен палеолита, найденных в Арктике на территории России, а также в образцах почв из районов многолетней мерзлоты. Их изучение поможет лучше понять эволюционные процессы формирования вирусов, исследовать молекулярные и эволюционные механизмы адаптации животных к вирусным и бактериаль-

- Zink, A. R., Reischl, U., Wolf, H., and Nerlich, A. G. (2002) Molecular analysis of ancient microbial infections, *FEMS Microbiol. Lett.*, **213**, 141-147, doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11298.x.
- 2. Buikstra, J. E., and Roberts, C. (2012) *The Global History* of *Paleopathology: Pioneers and Prospects*, Oxford Univ. Press.
- Arriaza, B. T., Salo, W., Aufderheide, A. C., and Holcomb, T. A. (1995) Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: Molecular and skeletal evidence, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 98, 37-45, doi: 10.1002/ajpa.1330980104.
- Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O., and Raoult, D. (1998) Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12637-12640, doi: 10.1073/pnas.95.21.12637.
- Pääbo S. (1989) Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1939-1943, doi: 10.1073/ pnas.86.6.1939.
- Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L., Green, R. E., Kelso, J., et al. (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14616-14621, doi: 10.1073/pnas.0704665104.
- Warinner, C., Herbig, A., Mann, A., Fellows Yates, J. A., Weiß, C. L., et al. (2017) A Robust framework for microbial archaeology, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 18, 321-356, doi: 10.1146/annurev-genom-091416-035526.
- 8. Latham, K. E., and Miller, J. J. (2018) DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts, *Forensic Sci. Res.*, **4**, 51-59, doi: 10.1080/20961790.2018. 1515594.
- Müller, R., Roberts, C. A., and Brown, T. A. (2016) Complications in the study of ancient tuberculosis: presence of environmental bacteria in human archaeological remains, *J. Archaeol. Sci.*, 68, 5-11, doi: 10.1016/j.jas.2016. 03.002.
- Gilbert, M., Cuccui, J., White, W., Lynnerup, N., Titball, R. W., et al. (2004) Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims, *Microbiology (Reading)*, **150**, 341-354, doi: 10.1099/mic.0.26594-0.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., and Knight, R. (2014) The Earth microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biol.*, **12**, 69, doi: 10.1186/s12915-014-0069-1.
- Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome, *Nature*, 486, 207-214, doi: 10.1038/nature11234.

ным патогенам, а также оценить влияние эпидемий на генетическую структуру популяций человека и животных.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России, системный номер 075-10-2020-116 (грант № 13.1902.21.0023).

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

- Murray, D. C., Haile, J., Dortch, J., White, N. E., Haouchar, D., et al. (2013) Scrapheap challenge: a novel bulk-bone metabarcoding method to investigate ancient DNA in faunal assemblages, *Sci. Rep.*, **3**, 3371, doi: 10.1038/srep03371.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*, 7, 335-336, doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., et al. (2009) Introducing Mothur: opensource, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7537-7541, doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., et al. (2012) Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes, *Nat. Methods*, 9, 811-814, doi: 10.1038/nmeth.2066.
- Truong, D. T., Franzosa, E. A., Tickle, T. L., Scholz, M., Weingart, G., et al. (2015) MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling, *Nat. Methods*, **12**, 902-903, doi: 10.1038/nmeth.3589.
- Nayfach, S., Rodriguez-Mueller, B., Garud, N., and Pollard, K. S. (2016) An integrated metagenomics pipeline for strain profiling reveals novel patterns of bacterial transmission and biogeography, *Genome Res.*, 26, 1612-1625, doi: 10.1101/gr.201863.115.
- Darling, A. E., Jospin, G., Lowe, E., Matsen, F. A., Bik, H. M., et al. (2014) PhyloSift: phylogenetic analysis of genomes and metagenomes, *PeerJ*, 2, e243, doi: 10.7717/ peerj.243.
- Wood, D. E., and Salzberg, S. L. (2014) Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments, *Genome Biol.*, 15, R46, doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.
- Ounit, R., Wanamaker, S., Close, T. J., and Lonardi, S. (2015) CLARK: Fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers, *BMC Genomics*, 16, 236, doi: 10.1186/s12864-015-1419-2.
- 22. Ounit, R., and Lonardi, S. (2016) Higher classification sensitivity of short metagenomic reads with CLARK-S, *Bioinformatics*, **32**, 3823-3825, doi: 10.1093/bioinformatics/ btw542.
- Vågene, Å. J., Herbig, A., Campana, M. G., Robles García, N. M., Warinner, C., et al. (2018) Salmonella enterica genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico, *Nat. Ecol. Evol.*, 2, 520-528, doi: 10.1038/s41559-017-0446-6.

- 24. Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., et al. (2017) Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus, *Nature*, **544**, 357-361, doi: 10.1038/nature21674.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., et al. (2006) Greengenes, a chimerachecked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5069-5072, doi: 10.1128/AEM.03006-05.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., et al. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nat. Methods*, 13, 581-583, doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., et al. (2017) Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns, *mSystems*, 2, e00191-16, doi: 10.1128/mSystems.00191-16.
- Velsko, I. M., Frantz, L. A. F., Herbig, A., Larson, G., and Warinner, C. (2018) Selection of appropriate metagenome taxonomic classifiers for ancient microbiome research, *mSystems*, 3, e00080-18, doi: 10.1128/mSystems.00080-18.
- Ziesemer, K. A., Mann, A. E., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga, A. T., et al. (2015) Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification, *Sci. Rep.*, 5, 16498, doi: 10.1038/srep16498.
- Yuan, C., Lei, J., Cole, J., and Sun, Y. (2015) Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data, *Bioinformatics*, 31, i35-i43, doi: 10.1093/bioinformatics/ btv231.
- Hübler, R., Key, F. M., Warinner, C., Bos, K. I., Krause, J., et al. (2019) HOPS: Automated detection and authentication of pathogen DNA in archaeological remains, *Genome Biol.*, 20, 280, doi: 10.1186/s13059-019-1903-0.
- Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L., and Orlando, L. (2013) mapDamage2.0: Fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters, *Bioinformatics*, 29, 1682-1684, doi: 10.1093/bioinformatics/ btt193.
- Schuenemann, V. J., Singh, P., Mendum, T. A., Krause-Kyora, B., Jäger, G., et al. (2013) Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*, *Science*, 341, 179-183, doi: 10.1126/science.1238286.
- Warinner, C., Rodrigues, J. F., Vyas, R., Trachsel, C., Shved, N., et al. (2014) Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity, *Nat. Genet.*, 46, 336-344, doi: 10.1038/ng.2906.
- Wagner, D. M., Klunk, J., Harbeck, M., Devault, A., Waglechner, N., et al. (2014) *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541-543 AD: A genomic analysis, *Lancet Infect. Dis.*, 14, 319-326, doi: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
- Skinsnes O. K. (1973) Notes from the history of leprosy. I. Interpretive chronology of leprosy concept and practice, *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 41, 220-233.
- Ortner, D. J., and Putschar, W. G. J. (1985) Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains, Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Donoghue, H. D., Gladykowska-Rzeczycka, J., Marcsik, A., Holton, J., and Spigelman, M. (2002) Mycobacterium leprae in archaeological samples, in The Past and Present of Leprosy. Archaeological, Historical, Palaeopathological and Clinical Approaches (Roberts, Ch. A., Lewis, M., and Manchester, K., eds.) BAR International Series 1054, Bradford, pp. 271-286.
- Buzhilova, A. (2002) In *The Past and Present of Leprosy.* Archaeological, Historical, Palaeopathological and Clinical Approaches (Roberts, Ch. A., Lewis, M., and Manchester, K., eds.) BAR International Series 1054, Oxford, Archaeopress, pp. 123-133.

- 40. Manchester, K. (1984) Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation, *Med. Hist.*, **28**, 162-173, doi: 10.1017/S0025727300035705.
- 41. Lechat, M. F. (1999) The paleopathology of leprosy: an overview, *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, **67**, 460-470.
- 42. Brothwell, D. R., Powers, R., and Hirst, S. M. (2000) In Cannington Cemetery: Excavations 1962-3 of Prehistoric, Roman, post-Roman and Later Features at Cannington Park Quarry, Near Bridgewater, Somerset, London: Britannia Monograph Series No. 17, Society for the Promotion of Roman Studies, pp. 195-256.
- Blondiaux, J., Dürr, J., Khouchaf, L., and Eisenberg, L. E. (2002) In *The Past and Present of Leprosy. Archaeological, Historical, Palaeopathological and Clinical Approaches* (Roberts, Ch. A., Lewis, M., and Manchester, K., eds.) BAR International Series 1054, Oxford, Archaeopress.
- 44. Козак А. Д. (2002) К вопросу о существовании проказы в древнем Киеве, *OPUS: междисциплинарные исследова*ния в археологии, Изд-во ИА РАН, Москва, вып. 1-2.
- Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J. Y., et al. (2005) On the origin of leprosy, *Science*, **308**, 1040-1042, doi: 10.1126/science/1109759.
- Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., et al. (2009) Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*, *Nat. Genet.*, 41, 1282-1289, doi: 10.1038/ng.477.
 Schuenemann, V. J., Avanzi, C., Krause-Kyora, B.,
- Schuenemann, V. J., Avanzi, C., Krause-Kyora, B., Seitz, A., Herbig, A., et al. (2018) Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe, *PLoS Pathog.*, 14, 1-17, doi: 10.1371/journal.ppat. 1006997.
- Fotakis, A. K., Denham, S. D., Mackie, M., Orbegozo, M. I., Mylopotamitaki, D., et al. (2020) Multi-omic detection of *Mycobacterium leprae* in archaeological human dental calculus, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 375, 1812, doi: 10.1098/rstb.2019.0584.
- 49. Mendum, T. A., Schuenemann, V. J., Roffey, S., Taylor, G. M., Wu, H., et al. (2014) *Mycobacterium leprae* genomes from a British medieval leprosy hospital: Towards understanding an ancient epidemic, *BMC Genomics*, **15**, 270, doi: 10.1186/1471-2164-15-270.
- 50. Neukamm, J., Pfrengle, S., Molak, M., Seitz, A., Francken, M., et al. (2020) 2000-year-old pathogen genomes reconstructed from metagenomic analysis of Egyptian mummified individuals, *BMC Biol.*, **18**, 108, doi: 10.1186/s12915-020-00839-8.
- Robbins, G., Tripathy, V. M., Misra, V. N., Mohanty, R. K., Shinde, V. S., et al. (2009) Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.), *PLoS One*, 4, e5669, doi: 10.1371/journal.pone.0005669.
- 52. Blevins, K. E., Crane, A. E., Lum, C., Furuta, K., Fox, K., et al. (2020) Evolutionary history of *Mycobacterium leprae* in the Pacific Islands, *Philos. Trans. R Soc. B*, **378**, 20190582, doi: 10.1098/rstb.2019.0582.
- Stone, A. C., Lewis, C. M. Jr., and Schuenemann, V. J. (2020) Insights into health and disease from ancient biomolecules, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 375, doi: 10.1098/ rstb.2019.0568.
- Krause-Kyora, B., Nutsua, M., Boehme, L., Pierini, F., Pedersen, D. D., et al. (2018) Ancient DNA study reveals HLA susceptibility locus for leprosy in medieval Europeans, *Nat. Commun.*, 9, 1569, doi: 10.1038/s41467-018-03857-x.
- Schipper, R. F., Schreuder, G. M., D'Amaro, J., and Oudshoorn, M. (1996) HLA gene and haplotype frequencies in Dutch blood donors, *Tissue Antigens*, 48, 562-574, doi: 10.1111/j.1399-0039.1996.tb02670.x.
- 56. Müller, C. R., Ehninger, G., and Goldmann, S. F. (2003) Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A,

HLA-B, and HLA-DR based on over 13,000 German blood donors, *Hum. Immunol.*, **64**, 137-151, doi: 10.1016/s0198-8859(02)00706-1.

- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., et al. (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study, *N. Engl. J. Med.*, 357, 851-862, doi: 10.1056/NEJMoa073493.
- Gregersen, J. W., Kranc, K. R., Ke, X., Svendsen, P., Madsen, L. S., et al. (2006) Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis, *Nature*, 443, 574-577, doi: 10.1038/nature05133.
- Fischer, A., Grunewald, J., Spagnolo, P., Nebel, A., Schreiber, S., et al. (2014) Genetics of sarcoidosis, *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 35, 296-306, doi: 10.1055/s-0034-1376860.
- Hu, X., Deutsch, A. J., Lenz, T. L., Onengut-Gumuscu, S., Han, B., et al. (2015) Additive and interaction effects at three amino acid positions in HLA-DQ and HLA-DR molecules drive type 1 diabetes risk, *Nat. Genet.*, 47, 898-905. doi: 10.1038/ng.3353.
- Karlsson, E. K., Kwiatkowski, D. P., and Sabeti, P. C. (2014) Natural selection and infectious disease in human populations, *Nat. Rev. Genet.*, 15, 379-393, doi: 10.1038/ nrg3734.
- 62. Domínguez-Andrés, J., Kuijpers, Y., Bakker, O. B., Jaeger, M., Xu, C. J., et al. (2021) Evolution of cytokine production capacity in ancient and modern European populations, *Elife*, **10**, e64971, doi: 10.7554/eLife.64971.
- 63. Kerner, G., Patin, E., and Quintana-Murci, L. (2021) New insights into human immunity from ancient genomics, *Curr. Opin. Immunol.*, **72**, 116-125, doi: 10.1016/j.coi.2021. 04.006.
- 64 Faruque, S. M., Albert, M. J., and Mekalanos, J. J. (1998) Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1301-1314, doi: 10.1128/MMBR.62.4.1301-1314.1998.
- Piret, J., and Boivin, G. (2021) Pandemics throughout history, *Front. Microbiol.*, **11**, 631736, doi: 10.3389/fmicb. 2020.631736.
- Devault, A. M., Golding, G. B., Waglechner, N., Enk, J. M., Kuch, M., et al. (2014) Second-pandemic strain of *Vibrio cholerae* from the *Philadelphia cholera* outbreak of 1849, *N. Engl. J. Med.*, **370**, 334-340, doi: 10.1056/ NEJMoa1308663.
- Ramirez, D. A., Saka, H. A., and Nores, R. (2021) Detection of *Vibrio cholerae* aDNA in human burials from the fifth cholera pandemic in Argentina (1886-1887 AD), *Int. J. Paleopathol.*, **32**, 74-79, doi: 10.1016/j.ijpp.2020. 12.004.
- Gagneux, S. (2018) Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis, Nat. Rev. Microbiol., 16, 202-213, doi: 10.1038/nrmicro.2018.8.
- Menardo, F., Duchene, S., Brites, D., and Gagneux, S. (2019) The molecular clock of *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS Pathol.*, **15**, e1008067, doi: 10.1371/journal.ppat. 1008067.
- Bos, K. I., Harkins, K. M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., et al. (2014) Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis, *Nature*, **514**, 494-497, doi: 10.1038/ nature13591.
- Kay, G. L., Sergeant, M. J., Zhou, Z., Chan, J. Z., Millard, A., et al. (2015) Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe, *Nat. Commun.*, 6, 6717, doi: 10.1038/ncomms7717.
- 72. Sabin, S., Herbig, A., Vågene, Å. J., Ahlström, T., Bozovic, G., et al. (2020) A seventeenth-century *Mycobac*-

terium tuberculosis genome supports a Neolithic emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Genome Biol.*, **21**, 201, doi: 10.1186/s13059-020-02112-1.

- Silva-Pereira, T. T., Ikuta, C. Y., Zimpel, C. K., Camargo, N., de Souza Filho, A. F., et al. (2019) Genome sequencing of *Mycobacterium pinnipedii* strains: genetic characterization and evidence of superinfection in a South American sea lion (*Otaria flavescens*), *BMC Genomics*, 20, 1030, doi: 10.1186/s12864-019-6407-5.
- 74. McDonald, S. K., Matisoo-Smith, E. A., Buckley, H. R., Walter, R. K., Aung, H. L., et al. (2020) "TB or not TB": the conundrum of pre-European contact tuberculosis in the Pacific, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **375**, doi: 10.1098/rstb.2019.0583.
- Abel, L., Fellay, J., Haas, D. W., Schurr, E., Srikrishna, G., et al. (2018) Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: Present knowledge and future perspectives, *Lancet Infect. Dis.*, 18, e64-e75, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30623-0.
- 76. Kerner, G., Laval, G., Patin, E., Boisson-Dupuis, S., Abel, L., et al. (2021). Human ancient DNA analyses reveal the high burden of tuberculosis in Europeans over the last 2,000 years, *Am. J. Hum. Genet.*, **108**, 517-524, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.02.009.
- Gogarten, J. F., Düx, A., Schuenemann, V. J., Nowak, K., Boesch, C., et al. (2016) Tools for opening new chapters in the book of *Treponema pallidum* evolutionary history, *Clin. Microbiol. Infect.*, **22**, 916-921, doi: 10.1016/j.cmi. 2016.07.027.
- Hackett, C. J. (1963) On the origin of the human treponematoses (pinta, yaws, endemic syphilis and venereal syphilis), *Bull. World Health Organ.*, 29, 7-41.
- Rothschild, B. M. (2005) History of syphilis, *Clin. Infect. Dis.*, 40, 1454-1463, doi: 10.1086/429626.
- Majander, K., Pfrengle, S., Kocher, A., Neukamm, J., du Plessis, L., et al. (2020) Ancient bacterial genomes reveal a high diversity of *Treponema pallidum* strains in early modern Europe, *Curr. Biol.*, **30**, 3788-3803, doi: 10.1016/ j.cub.2020.07.058.
- Kolman, C. J., Centurion-Lara, A., Lukehart, S. A., Owsley, D. W., and Tuross, N. (1999) Identification of *Treponema pallidum* subspecies pallidum in a 200-year-old skeletal specimen, *J. Infect. Dis.*, **180**, 2060-2063, doi: 10.1086/315151.
- Von Hunnius, T. E., Yang, D., Eng, B., Waye, J. S., and Saunders, S. R. (2007) Digging deeper into the limits of ancient DNA research on syphilis, *J. Archaeol. Sci.*, 34, 2091-2100, doi: 10.1016/j.jas.2007.02.007.
- 83. Bouwman, A. S., and Brown, T. A. (2005) The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis, *J. Archaeol. Sci.*, **32**, 703-713, doi: 10.1016/j.jas.2004.11.014.
- Arora, N., Schuenemann, V. J., Jäger, G., Peltzer, A., Seitz, A., et al. (2016) Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster, *Nat. Microbiol.*, 2, 16245, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.245.
- Schuenemann, V. J., Lankapalli, A. K., Barquera, R., Nelson, E. A., Iraíz Hernández, D., et al. (2018) Historic *Treponema pallidum* genomes from Colonial Mexico retrieved from archaeological remains, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **12**, e0006447, doi: 10.1371/journal.pntd.0006447.
- Guedes, L., Dias, O., Neto, J., Ribeiro da Silva, L. D. P., Mendonça de Souza, S. M. F., et al. (2018) First paleogenetic evidence of probable syphilis and treponematoses cases in the Brazilian Colonial Period, *Biomed Res. Int.*, 8304129, doi: 10.1155/2018/8304129.
- Meffray, A., Perrin, M., Richier, A., Schmitt, A., Ardagna, Y., et al. (2019) Molecular detection of *Treponema pallidum* subspecies pallidum in 150-year-old

foetal remains, southeastern France, *J. Med. Microbiol.*, **68**, 761-769, doi: 10.1099/jmm.0.000978.

- Stenseth, N. C., Atshabar, B. B., Begon, M., Belmain, S. R., Bertherat, E., et al. (2008) Plague: Past, present, and future, *PLoS Med.*, 5, e3, doi: 10.1371/journal.pmed. 0050003.
- 89. Scott, S., and Duncan, C. J. (2001) *Biology of Plagues: Evidence from Historical Populations*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 90. Frith, J. (2012) The history of plague Part 1. The three great pandemics, J. Mil. Veterans' Health, 20, 11-16.
- Barbieri, R., Signoli, M., Chevé, D., Costedoat, C., Tzortzis, S., et al. (2020) Yersinia pestis: the natural history of Plague, *Clin. Microbiol. Rev.*, 34, e00044-19, doi: 10.1128/CMR.00044-19.
- 92. Кузнецова И. Л., Андреева Т. В., Малярчук А. Б., Кунижева С. С., Тяжелова Т. В., и др. (2021) Геномика древних патогенов на примере чумной палочки (*Yersinia pestis*) в историческом контексте, *Российская археология* (в печати).
 93. Kocher, A., Papac, L., Barquera, R., Key, F. M., Spyrou,
- Kocher, A., Papac, L., Barquera, R., Key, F. M., Spyrou, M. A., et al. (2021) Ten millennia of hepatitis B virus evolution, *Science*, **374**, 182-188, doi: 10.1126/science. abi5658.
- 94. Mühlemann, B., Jones, T.C., Damgaard, P. B., Allentoft, M. E., Shevnina, I., et al. (2018) Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period, *Nature*, 557, 418-423, doi: 10.1038/s41586-018-0097-z.
- 95. Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Ježek, Z., and Ladnyi, I. D. (1988) *Smallpox and Its Eradication*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 96. Hopkins, D. R. (2002) *The Greatest Killer: Smallpox in History*, University of Chicago Press, Chicago, IL.
- 97. Massung, R. F., Liu, L. I., Qi, J., Knight, J. C., Yuran, T. E., et al. (1994) Analysis of the complete genome of smallpox *Variola major* virus strain Bangladesh-1975, *Virology*, **201**, 215-240, doi: 10.1006/viro.1994.1288.
- 98. Massung, R. F., Loparev, V. N., Knight, J. C., Totmenin, A. V., Chizhikov, V. E., et al. (1996) Terminal region sequence variations in variola virus DNA, *Virology*, **221**, 291-300, doi: 10.1006/viro.1996.0378.
- 99. Shchelkunov, S. N., Massung, R. F., and Esposito, J. J. (1995) Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses, *Virus Res.*, **36**, 107-118, doi: 10.1016/0168-1702(94)00113-q.
- Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V., Loparev, V. N., Safronov, P. F., Gutorov, V. V., et al. (2000) Alastrim smallpox *Variola minor* virus genome DNA sequences, *Virology*, 266, 361-386, doi: 10.1006/viro.1999.0086.
- 101. Esposito, J. J., Sammons, S. A., Frace, A. M., Osborne, J. D., Olsen-Rasmussen, M., et al. (2006) Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus, *Science*, **313**, 807-812, doi: 10.1126/ science.1125134.
- 102. Duchêne, S., Holmes, E. C., and Ho, S. Y. (2014) Analyses of evolutionary dynamics in viruses are hindered by a timedependent bias in rate estimates, *Proc. Biol. Sci.*, 281, 20140732, doi: 10.1098/rspb.2014.0732.
- 103. Senkevich, T. G., Yutin, N., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Moss, B. (2021) Ancient gene capture and recent gene loss shape the evolution of orthopoxvirus-host interaction genes, *mBio*, **12**, e0149521, doi: 10.1128/mBio.01495-21.
- 104. Shchelkunov, S. N., Safronov, P. F., Totmenin, A. V., Petrov, N. A., Ryazankina, O. I., et al. (1998) The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins, *Virology*, **243**, 432-460, doi: 10.1006/viro.1998.9039.

- 105. Mühlemann, B., Vinner, L., Margaryan, A., Wilhelmson, H., de la Fuente Castro, C., et al. (2020) Diverse variola virus (smallpox) strains were widespread in northern Europe in the Viking Age, *Science*, **369**, eaaw8977, doi: 10.1126/science.aaw8977.
- 106. Shchelkunov, S. N. (2012) Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism, *Adv. Virol.*, 2012, 524743, doi: 10.1155/2012/524743.
- 107. Pajer, P., Dresler, J., Kabickova, H., Písa, L., Aganov, P., et al. (2017) Characterization of two historic smallpox specimens from a Czech Museum, *Viruses*, 9, 200, doi: 10.3390/v9080200.
- Duggan, A. T., Perdomo, M. F., Piombino-Mascali, D., Marciniak, S., Poinar, D., et al. (2016) 17th century *Variola virus* reveals the recent history of smallpox, *Curr. Biol.*, 26, 3407-3412, doi: 10.1016/j.cub.2016.10.061.
- 109. Biagini, P., Thèves, C., Balaresque, P., Géraut, A., Cannet, C., et al. (2012) *Variola virus* in a 300-year-old Siberian mummy, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 2057-2059, doi: 10.1056/NEJMc1208124.
- 110. Ferrari, G., Neukamm, J., Baalsrud, H. T., Breidenstein, A. M., Ravinet, M., et al. (2020) *Variola virus* genome sequenced from an eighteenth-century museum specimen supports the recent origin of smallpox, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **375**, doi: 10.1098/rstb. 2019.0572.
- 111. Hopkins, D. R. (1983) *Princes and Peasants: Smallpox in History*, Univ. of Chicago Press, Chicago and London.
- 112. Kochneva, G., Kolosova, I., Maksyutova, T., Ryabchikova, E., and Shchelkunov, S. (2005) Effects of deletions of kelch-like genes on cowpox virus biological properties, *Arch. Virol.*, **150**, 1857-1870, doi: 10.1007/ s00705-005-0530-0.
- 113. Hendrickson, R. C., Wang, C., Hatcher, E. L., and Lefkowitz, E. J (2010) Orthopoxvirus genome evolution: the role of gene loss, *Viruses*, 2, 1933-1967, doi: 10.3390/ v2091933.
- 114. Jenner, E. (1798) An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae: A Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of Cow Pox, London: Printed for the author by Samson Low, No. 7, Berwick Street, Soho.
- Tulman, E. R., Delhon, G., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., et al. (2006) Genome of horsepox virus, *J. Virol.*, 80, 9244-9258, doi: 10.1128/JVI.00945-06.
- 116. Duggan, A. T., Klunk, J., Porter, A. F., Dhody, A. N., Hicks, R., et al. (2020) The origins and genomic diversity of American Civil War Era smallpox vaccine strains, *Genome Biol.*, **21**, 175, doi: /10.1186/s13059-020-02079-z.
- 117. Schrick, L., Tausch, S. H., Dabrowski, P. W., Damaso, C. R., Esparza, J., et al. (2017) An early American smallpox vaccine based on horsepox, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 1491-1492, doi: 10.1056/NEJMc1707600.
- 118. Qin, L., Favis, N., Famulski, J., and Evans, D. H. (2015) Evolution of and evolutionary relationships between extant vaccinia virus strains, *J. Virol.*, *89*, 1809-1824, doi: 10.1128/JVI.02797-14.
- 119. Mathieson, I., Lazaridis, I., Rohland, N., Mallick, S., Patterson, N., et al. (2015) Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians, *Nature*, **528**, 499-503, doi: 10.1038/nature16152.
- 120. Lindo, J., Huerta-Sánchez, E., Nakagome, S., Rasmussen, M., Petzelt, B., et al. (2016) A time transect of exomes from a Native American population before and after European contact, *Nat. Commun.*, 7, 13175, doi: 10.1038/ncomms13175.
- 121. Li, W., O'Neill, K. R., Haft, D. H., DiCuccio, M., Chetvernin, V., et al. (2021) RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with pro-

tein family model curation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D1020-D1028, doi: 10.1093/nar/gkaa1105.

- Pierce, N. T., Irber, L., Reiter, T., Brooks, P., and Brown, C. T. (2019) Large-scale sequence comparisons with sourmash, *F1000Res.*, 8, 1006, doi: 10.12688/f1000research. 19675.1.
- 123. Wood, D. E., Lu, J., and Langmead, B. (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2, *Genome Biol.*, 20, 257, doi: 10.1186/s13059-019-1891-0.
- 124. Cárdenas, Y. O. A., Neuenschwander, S., and Malaspinas, A.-S. (2021) Benchmarking metagenomics classifiers on ancient viral DNA: a simulation study, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.30.442132.
- 125. Wibowo, M. C., Yang, Z., Borry, M., Hübner, A., Huang, K. D., et al. (2021) Reconstruction of ancient microbial genomes from the human gut, *Nature*, **594**, 234-239, doi: 10.1038/s41586-021-03532-0.
- 126. Borry, M., Hübner, A., Rohrlach, A. B., and Warinner, C. (2021) PyDamage: automated ancient damage identification and estimation for contigs in ancient DNA *de novo* assembly, *PeerJ*, 9, e11845, doi: 10.7717/peerj.11845.
- 127. Fellows Yates, J. A., Andrades Valtueña, A., Vågene, Å. J., Cribdon, B., Velsko, I. M., et al. (2021) Community-curated and standardised metadata of published ancient metagenomic samples with AncientMetagenomeDir, *Sci. Data*, 8, 31, doi: 10.1038/s41597-021-00816-y.

- 128. Vernot, B., Zavala, E. I., Gómez-Olivencia, A., Jacobs, Z., Slon, V., et al. (2021) Unearthing Neanderthal population history using nuclear and mitochondrial DNA from cave sediments, *Science*, **372**, eabf1667, doi: 10.1126/science.abf1667.
- 129. Zavala, E. I., Jacobs, Z., Vernot, B., Shunkov, M. V., Kozlikin, M. B., et al. (2021) Pleistocene sediment DNA reveals hominin and faunal turnovers at Denisova Cave, *Nature*, **595**, 399-403, doi: 10.1038/s41586-021-03675-0.
- 130. Ng, T. F., Chen, L. F., Zhou, Y., Shapiro, B., Stiller, M., et al. (2014) Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **111**, 16842-16847, doi: 10.1073/pnas.1410429111.
- 131. Smith, O., Dunshea, G., Sinding, M. S., Fedorov, S., Germonpre, M., et al. (2019) Ancient RNA from Late Pleistocene permafrost and historical canids shows tissuespecific transcriptome survival, *PLoS Biol.*, **17**, e3000166, doi: 10.1371/journal.pbio.3000166.
- 132. Düx, A., Lequime, S., Patrono, L. V., Vrancken, B., Boral, S., et al. (2020) Measles virus and rinderpest virus divergence dated to the sixth century BCE, *Science*, **368**:1367-1370, doi: 10.1126/science.aba9411.
- 133. Gryseels, S., Watts, T. D., Kabongo Mpolesha, J. M., Larsen, B. B., Lemey, P., et al. (2020) A near full-length HIV-1 genome from 1966 recovered from formalin-fixed paraffin-embedded tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117, 12222-12229, doi: 10.1073/pnas.1913682117.

GENOMICS OF ANCIENT PATHOGENS: FIRST ADVANCES AND PROSPECTS

Review

A. B. Malyarchuk^{1*}, T. V. Andreeva^{1,2}, I. L. Kuznetsova^{2,3}, S. S. Kunizheva^{2,3}, M. S. Protasova², L. I. Uralsky^{2,3}, T. V. Tyazhelova², F. E. Gusev², A. D. Manakhov^{2,3}, and E. I. Rogaev^{2,3,4*}

¹ Center for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: a_malyarchuk98@mail.ru

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; e-mail: rogaev@vigg.ru

³ Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia

⁴ Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Shrewsbury, MA 01545, USA

The development of paleogenomic studies is one of the actual and perspective areas of interdisciplinary research in today's world science. New genomic methods of ancient DNA (aDNA) analysis, such as high-throughput sequencing (NGS) technologies, allow not only to obtain detailed genetic information about historical and prehistoric human populations, but also to study individual microbial and viral pathogens and microbiomes from different ancient and historical sites. Studies of aDNA of pathogens by reconstructing their genomes have so far yielded the complete sequences of ancient pathogens that have played a significant role in the history of the world: *Yersinia pestis* (plague), *Variola virus* (smallpox), *Vibro cholerae* (cholera), HBV (hepatitis B virus), as well as the equally important endemic human infectious agents – *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Mycobacterium leprae* (leprosy) and *Treponema pallidum* (syphilis). Genomic data from these pathogens from past pandemics, but also to recognize pathogen lineages that are now extinct, to refine the chronology of pathogen appearance in human populations, and to reconstruct the evolutionary history of pathogens that are still relevant to public health today. In this review, we describe the state-of-the-art of genomic research of the origins and evolution of many ancient pathogens and viruses and examine the mechanisms of the emergence and spread of ancient infections in the history of mankind.

Keywords: human populations, ancient DNA, paleopathology, paleogenomics, pathogen, plague, cholera, leprosy, syphilis, smallpox, tuberculosis

УДК 577.25

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ОПСИНОВ В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА САМОК И САМЦОВ ТРЁХИГЛОЙ КОЛЮШКИ Gasterosteus aculeatus L.: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ПРЕСНОВОДНОЙ АДАПТАЦИИ И ПРОЛАКТИНА

© 2022 Н.С. Павлова^{1*}, А.Р. Гизатулина², Т.В. Неретина³, О.В. Смирнова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119991 Москва, Россия; электронная почта: pav.nad.ser@gmail.com
² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины,

кафедра физиологии и общей патологии, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова; 186671 пос. Приморский, Лоухский р-н, Карельская республика, Россия

> Поступила в редакцию 01.01.2022 После доработки 24.01.2022 Принята к публикации 24.01.2022

Чувствительность цветового зрения играет важную роль в адаптивных процессах у рыб, в особенности – при миграциях и в репродуктивном цикле. В обоих этих процессах у рыб важную функцию выполняет гормон пролактин и его паралог, пролактин-подобный гормон. Для изучения возможного вклада пролактиновой оси в пресноводную адаптацию цветового зрения рыб проведено исследование влияния пресноводной адаптации в нерестовый период, а также введения пролактина на экспрессию генов опсинов (SWS1, SWS2, RH2, LWS) в сетчатке глаза самок и самцов трёхиглой колюшки Gasterosteus aculeatus L. Показано, что у самок, в отличие от самцов, при пресноводной адаптации растёт экспрессия гена пролактина-1 и также, как у самцов, падает экспрессия гена пролактин-подобного гормона в мозге. При пресноводной адаптации, а также при введении пролактина в условиях морской воды в сетчатке глаз самок и самцов снижается экспрессия гена опсина SWS2, чувствительного в синей области спектра. В сетчатке глаза самцов при введении пролактина в условиях морской воды, но не при пресноводной адаптации снижается также экспрессия гена опсина SWS1, чувствительного в ультрафиолетовой области спектра. Экспрессия других опсинов при пресноводной адаптации не является пролактинзависимой ни у самок, ни у самцов. Можно заключить, что экспрессия генов некоторых опсинов в сетчатке глаза трёхиглой колюшки регулируется пролактином и может пролактинзависимо меняться в условиях пресноводной адаптации, что расширяет понимание адаптивной значимости пролактиновой оси для организма рыб при пресноводных миграциях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пролактин, опсины, трёхиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L., пресноводная адаптация, адаптация цветового зрения, зависимость от пола.

DOI: 10.31857/S0320972522020099

ВВЕДЕНИЕ

Цветовое зрение и его чувствительность в разных областях спектра у позвоночных, в том числе у рыб, опосредовано наличием и соотношением зрительных пигментов в колбочках сетчатки. В состав молекул-фоторецепторов входит опсин, ковалентно связанный с хромофорной

* Адресат для корреспонденции.

группой – 11-цис-изомером ретиналя, производным витамина А. Структура опсина определяет спектр поглощения колбочки - её спектральную чувствительность [1]. Опсины, ассоциированные с цветовым зрением, подразделяются на четыре группы: SWS1 чувствителен в ультрафиолетово-синей области спектра, SWS2 - в синей, RH2 – в зелёной и LWS – в красной [2]. Изменение соотношения экспрессии генов различных опсинов сопровождается соответствующим изменением зрительной чувствительности в разных областях спектра [3, 4]. В сетчатке глаза рыб описаны опсины всех типов, при этом на их соотношение влияет ряд параметров, в особенности экология вида и стадия репродуктивного цикла [5]. Исследования цихлид показали, что виды, обитающие на большей глубине, более чувствительны к коротковолновому, нежели

Принятые сокращения: Prl1 – пролактин-1; Prl2 – пролактин-2 или пролактин-подобный гормон; oPrl – овечий пролактин; SWS1 – опсин колбочек, чувствительных в коротковолновой ультрафиолетово-синей области спектра; SWS2 – опсин колбочек, чувствительных в коротковолновой синей области спектра; RH2 – опсин колбочек, чувствительных в средневолновой зелёной области спектра; LWS – опсин колбочек, чувствительных в длинноволновой красной области спектра.

к длинноволновому, излучению видимого спектра, что связано с превалированием соответствующей части спектра [6]. Интенсивность экспрессии опсинов также зависит от прозрачности воды: на флоридской лукании Lucania goodei показано, что у особей в прозрачной воде экспрессия генов опсинов SWS1 и SWS2 выше, а генов опсинов RH2 и LWS - ниже, чем у особей в мутной воде. Эти данные воспроизводились в экспериментальных условиях [7]. В случае, если вид эвригалинный, то морская и пресноводная популяции также различаются по экспрессии генов опсинов. В работах, посвящённых чувствительности цветового зрения трёхиглой колюшки Gasterosteus aculeatus L. из морских и пресноводных популяций, показано, что у резидентных морских колюшек более высокие уровни экспрессии опсина SWS1 и LWS (последнего – только в лабораторных условиях), и более низкие — опсина RH2 по сравнению с резидентными пресноводными колюшками [8]. Однако данные по пластичности цветового зрения у проходных рыб, меняющих среду обитания с морской на пресноводную в ходе жизненного цикла, отсутствуют.

В условиях пресноводной миграции рыб, которая обычно связана с брачным периодом, адаптация цветового зрения может быть важным и даже необходимым условием для распознавания полового партнёра или конкурента, если для вида характерно приобретение брачного окраса, что чаще встречается у самцов. Влияние половых гормонов и репродуктивного периода на сетчатку показано для ряда рыб. Так, у самок цихлид, в частности Astatotilapia burtoni, в брачный период повышается пластичность и меняется чувствительность цветового зрения, опосредованная изменением экспрессии генов опсинов, с превалированием коротковолновых опсинов [9]. Для ряда видов рыб (трёхиглая колюшка G. aculeatus, золотая рыбка Carassius auratus, обыкновенная гамбузия Gambusia affinis) показано, что андрогены и эстрогены способны модулировать зрительную чувствительность к длинноволновому излучению [10-12].

Трёхиглая колюшка *G. aculeatus* L. является перспективным объектом для изучения зависимой от пресноводной адаптации и пола особи пластичности цветового зрения. Это связано, с одной стороны, с эвригалинностью вида, с другой — с наличием сложного репродуктивного цикла, который сопровождается приобретением самцами брачного окраса и миграцией части морской популяции в пресноводные водоёмы [13]. Для трёхиглой колюшки было показано влияние на цветовое зрение как экологических условий, так и некоторых гормонов, ассоциированных с репродукцией, за исключением пролактина [8, 10]. В сетчатке трёхиглой колюшки присутствуют опсины всех четырёх типов, не имеющие паралогов, в отличие от большинства других видов рыб, что приближает цветовое зрение колюшек по функциональным характеристикам к таковому у млекопитающих [14–16].

В условиях пресноводной миграции в нерестовый период пролактин участвует в адаптации водно-солевого обмена колюшек, как и других видов рыб, к пресной воде. При этом у рыб позднее был обнаружен паралог пролактина, которому присвоили название пролактин-подобный гормон или пролактин-2 (Prl2), в связи с чем обнаруженному ранее гормону присвоили название пролактин-1 (Prl1). Ранее нами показано, что при острой (24-часовой) пресноводной адаптации экспрессия генов пролактиновой оси в ткани мозга (вместе с гипофизом) самок и самцов трёхиглой колюшки меняется неодинаково, что свидетельствует о зависимой от пола пролактиновой регуляции у колюшек [17]. Описано влияние пролактина на сетчатку глаза млекопитающих, однако его эффекты обычно связывают со стимуляцией васкуляризации, в частности во время развития сетчатки, и антиоксидантным эффектом, смягчающим проявления старения организма [18, 19]. В ряде исследований показано наличие элементов пролактиновой оси в сетчатке рыб. Так, экспрессия пролактина-2 была обнаружена в ганглионарном, внутреннем и наружном ядерных слоях сетчатки Danio rerio, и были доказаны его паракринные эффекты на сетчатку при эмбриональном развитии. Наружный ядерный слой представлен телами клеток-фоторецепторов: палочек и колбочек. Таким образом, сетчатка рыб, как и прочих позвоночных, чувствительна к пролактину, и в ней известны паракринные эффекты пролактина-2 [20].

Нами была выдвинута гипотеза о возможном и зависимом от пола участии пролактинов в адаптации к пресной воде не только водно-солевого обмена, но и цветового зрения колюшек. Для её проверки мы проанализировали изменение экспрессии генов опсинов в сетчатке самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях острой и хронической пресноводной адаптации, а также при введении пролактина в условиях морской воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель. Работа выполнена на группах половозрелых самок и самцов трёхиглой колюшки *G. aculeatus* L. морской популя-

ции, находящихся в нерестовом состоянии. Животных (длина тела самок составила 7 ± 0.32 см, самцов – 6,5 ± 0,3 см) отлавливали в Кандалакшском заливе Белого моря в июне 2020 г. Особи были разделены по полу, самцы также разделены по интенсивности окраски на альфа- и омега-самцов. Внутри этих групп были сформированы четыре экспериментальные группы: контрольная «К» (морская популяция), группа острой пресноводной адаптации «24 часа», группа хронической пресноводной адаптации «72 часа», группа с введением морской популяции овечьего пролактина «oPrl», n = 6 для каждой группы. Группы альфа- и омега-самцов в дальнейшем были объединены, поскольку ни по одному из изучаемых параметров между ними не было обнаружено статистически значимых различий, таким образом, для групп самцов n = 12. Перед началом эксперимента все особи были адаптированы к условиям содержания (аквариумы объёмом 20 литров с непрозрачными стенками, световой и температурный режим соответствовали естественным условиям) в течение 24 ч. Особи группы «К» находились в течение всего эксперимента в условиях морской воды. Особи группы «24 часа» были помещены на 24 ч в пресную воду. Особи группы «72 часа» были помещены в пресную воду на 72 ч. Особи группы «oPrl» находились в течение 72 ч в условиях морской воды, но один раз в сутки им производили внутрибрюшинную инъекцию 50 мкл физиологического раствора с овечьим пролактином («National hormone and peptide program», США) в концентрации 14 МЕ/мл. Овечий пролактин был выбран для применения в эксперименте, поскольку широко используется в работах по изучению влияния пролактина на осморегуляцию и репродукцию рыб и связывается с обоими рецепторами пролактина рыб с достаточно высоким сродством, хотя и меньшим, чем гомологичный пролактин [21-23]. Группу положительного контроля, которой вводили физиологический раствор в условиях морской воды, в эксперименте не использовали, так как наши предыдущие исследования показали, что по изучаемым параметрам особи не отличаются от контрольных. По завершении эксперимента у особей удаляли мозг вместе с гипофизом (для контроля экспрессии генов пролактинов), а также ткань сетчатки; образцы фиксировали в IntactRNA («Евроген», Россия).

Обработка материала. Из ткани мозга (с гипофизом) и сетчатки выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом с полиакриламидным осаждением нуклеиновых кислот, используя набор ExtractRNA («Евроген»). Для синтеза кДНК использовали MMLV-ревертазу и случайные праймеры («Евроген»). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовали амплификатор Bio-Rad CFX96 («Bio-Rad», Kaнaдa) и набор реакционных смесей с красителем SYBRgreen и низкой концентрацией референсного красителя ROX («Евроген») и специфичные праймеры (таблица). Режим амплификации: 95 °C – 5 мин; 95 °C – 15 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 20 с, 40 циклов; кривая плавления 60 – 95 °С, инкремент 0,5 °С – 5 с. Каждую реакцию с использованием кДНК проводили в трёх независимых экспериментах; для каждого исследуемого гена также проводили безревертазные контроли амплификации фрагмента геномной ДНК. Если безревертазный контроль был отрицательным, значения ПЦР с матрицы кДНК использовали для расчётов. Подробно методика описана Pierce et al. [24]. При проведении ПЦР в реальном времени значения экспрессии генов интереса Prl1 и Prl2 нормировали на уровень экспрессии референсных генов *Rpl13*а и *Ubc* [25]. Значения экспрессии генов интереса (SWS1, SWS2, RH2 и LWS) нормировали на уровень экспрессии референсных генов Ubc и GNAT2 [26]. Для расчётов использовали формулу, применявшуюся в предыдущих работах [17].

Статистический аналих данных. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием опеway ANOVA (однофакторные сравнения) и twoway ANOVA (двухфакторные сравнения). В обоих случаях использовали тест Даннетта. На графиках для каждой группы данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили, а также минимального и максимального значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние адаптации к пресной воде на экспрессию генов пролактинов в ткани мозга самок *G. aculeatus* L. Экспрессия гена пролактина-1 в ткани мозга самок трёхиглой колюшки повышалась в ходе адаптации к пресной воде: относительные количества мРНК гена *Prl1* были достоверно выше в мозге самок как после 24, так и после 72 ч адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 1, *a*). Экспрессия гена пролактина-2 в ткани мозга самок, напротив, снижалась: мРНК гена *Prl2* не была обнаружена в мозге самок ни после 24, ни после 72 ч адаптации к пресной воде, что статистически отличалось от данного параметра у контрольной группы (рис. 1, *б*).

Ген	Нуклеотидная последовательность прямого (for) и обратного (rev) праймеров, 5'-3'	Длина ПЦР-продукта, п.н.
Prl1	for – ACCTGGACTCGCATTTGCCTCTC rev – AAGGTCCGACTCTGGTACTTGAAG	125
Prl2	for – TCCAATAAAGCCCTAGAGATGAG rev – AGGCTGCTGACGGTGTTGCTTAT	113
SWS1	for – TGGAGCAGGTACATCCCTGA rev – GAGCTGCTACAGCTCGAAGA	184
SWS2	for – GCAAGCCGCTTGGTAACTTC rev – TCTGGGATGTACCTGCTCC	124
RH2	for – GTACCTTCCTGAGGGCATG rev – GGCTGCGGCAGCTTTGACT	135
LWS	for – GCTGCGGCTAACCCTGGA rev – ACATGAACGGAACTGCCGG	126
Rpl13a	for – CACCTTGGTCAACTTGAACAGTG rev – TCCCTCCGCCCTACGAC	178
Ubc	for – AGACGGGCATAGCACTTGC rev – CAGGACAAGGAAGGCATCC	180
GNAT2	for – GTTACTGCTTGGTGCTGGTG rev – CTTCTGTGCATTCTCCTGTGA	211

Нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров генов интереса и референсных генов, а также длина ПЦР-продукта

Влияние 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде и экзогенного пролактина на экспрессию генов опсинов в ткани сетчатки самок *G. aculeatus* L. Экспрессия гена *SWS1*, кодирующего опсин, чувствительный в ультрафиолетово-синей области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации менялась неодинаково. После 24-часовой адаптации к пресной воде экспрессия гена *SWS1* в сетчатке самок была достоверно выше по сравнению как с контрольной группой, так и с группой 72-часовой пресноводной адаптации. Относительные количества мРНК гена *SWS1* в контрольной группе и группе, претерпевшей пресноводную адаптацию в течение 72 ч, были на сопоставимом уровне (рис. 2, *a*). Ежедневное введение овечьего пролактина в течение 72 ч в условиях морской воды не оказало достоверного влияния на экспрессию гена *SWS1* в ткани сетчатки самок колюшек (рис. 2, δ).



Рис. 1. Экспрессия мРНК генов *Prl1* (*a*) и *Prl2* (*b*) в ткани мозга самок трёхиглой колюшки в условиях морской воды (контроль «К» – незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно), ** p < 0,01; **** p < 0,0001 – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; n = 6 в каждой из групп)



Рис. 2. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в коротковолновой области спектра, в сетчатке глаз самок трёхиглой колюшки: *SWS1* (a, b), *SWS2* (b, c). a и b – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); b и c – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «оPrl» (пёстрые боксы), * p < 0,05; ** p < 0,01 – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; n = 6 в каждой из групп)

Экспрессия гена *SWS2*, кодирующего опсин, чувствительный в синей области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации уменьшалась: относительные количества мРНК гена *SWS2* были достоверно ниже в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 2, e). В условиях морской воды на фоне введения пролактина экспрессия гена *SWS2* в сетчатке также была на более низком уровне по сравнению с контрольной группой (рис. 2, e).

Экспрессия гена *RH2*, кодирующего опсин, чувствительный в зелёной области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации повышалась: относительные количества мРНК гена *RH2* были достоверно выше в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 3, *a*). В условиях морской воды на фоне введения пролактина уровень экспрессии гена *RH2* в сетчатке был сопоставим с контрольной группой (рис. 3, *б*).

Экспрессия гена *LWS*, кодирующего опсин, чувствительный в красной области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации повышалась: относительные количества мРНК гена *LWS* были достоверно выше в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 3, e). В условиях морской воды после введения экзогенного пролактина экспрессия гена *LWS* в сетчатке росла недостоверно (рис. 3, e).

Сравнение экспрессии исследуемых генов у α и ω -самцов *G. aculeatus* L. в контрольной и экспериментальных группах. По экспрессии всех генов интереса (*Prl1* и *Prl2* в ткани мозга с гипофизом, *SWS1*, *SWS2*, *RH2* и *LWS* в ткани сетчатки) непарный *t*-test не выявил достоверных различий между α - и ω -самцами ни в группе контроля «К», ни в группах 24-часовой «24 часа» и 72-часовой «72 часа» пресноводной адаптации, ни в группах особей, которым в условиях морской воды вводили овечий пролактин (oPrl) (p > 0,1). Поэтому группы α - и ω -самцов объединены, и таким образом, в группах самцов размер выборки составил 12 особей.

Влияние адаптации к пресной воде на экспрессию генов пролактинов в ткани мозга самцов *G. aculeatus* L. Экспрессия гена пролактина-1 в ткани мозга самцов трёхиглой колюшки не ме-

нялась в ходе адаптации к пресной воде (рис. 4, *a*). Экспрессия гена пролактина-2 в ткани мозга самцов достоверно снижалась как после 24-, так и после 72-часовой адаптации к пресной воде (рис. 4, δ). Влияние 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде и экзогенного пролактина на экспрессию генов опсинов в ткани сетчатки самцов G. aculeatus L. Экспрессия гена SWS1, кодирующего опсин, чувствительный в ультрафиолетово-синей



Рис. 3. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в длинноволновой области спектра, в сетчатке глаз самок трёхиглой колюшки: *RH2* (a, δ), *LWS* (s, e). a и s – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); δ и e – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «оРгl» (пёстрые боксы), * p < 0.05; ** p < 0.01 – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (опеway ANOVA; n = 6 в каждой из групп)



Рис. 4. Экспрессия мРНК генов *Prl1* (*a*) и *Prl2* (*б*) в ткани мозга самцов трёхиглой колюшки в условиях морской воды «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно), * p < 0.05 – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; n = 12в каждой из групп)

области спектра, в ткани сетчатки глаз самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации менялась неодинаково. После 24-часовой адаптации к пресной воде экспрессия гена SWS1 в сетчатке самцов была достоверно ниже по сравнению как с контрольной группой, так и с группой 72-часовой пресноводной адаптации. Относительные количества мРНК гена SWS1 в контрольной группе и группе, претерпевшей пресноводную адаптацию в течение 72 ч, были на сопоставимом уровне (рис. 5, a). После ежедневного введения пролактина в течение 72 ч относительные количества мРНК гена SWS1 в сетчатке самцов были достоверно ниже по сравнению с контрольной группой (рис. 5, б).

Экспрессия гена *SWS2*, кодирующего опсин, чувствительный в синей области спектра, в ткани сетчатки глаз самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации уменьшалась: относительные количества мРНК гена *SWS2* были достоверно ниже в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 5, *в*). В условиях морской воды после введения экзогенного пролактина экспрессия гена *SWS2* в сетчатке самцов также была на более низком уровне по сравнению с контрольной группой (рис. 5, *г*).

Экспрессия генов *RH2* и *LWS*, кодирующих опсины, чувствительные в зелёной и красной области спектра соответственно, в ткани сетчатки глаз самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации не менялась (рис. 6, *a* и *в*). В условиях морской воды после введения пролактина экспрессия генов *RH2* и *LWS* в сетчатке была сопоставима с их экспрессией в контрольной группе (рис. 6, δ и *г*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменения уровней экспрессии генов *Prl1* и *Prl2* в мозге трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации зависят от пола. Известно, что при пресноводной адаптации пролактиновая ось рыб стимулируется, однако эти эффекты были обнаружены и изучены на смешанных выборках, без разделения особей по



Рис. 5. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в коротковолновой области спектра, в сетчатке глаз самцов трёхиглой колюшки: *SWS1* (a, b), *SWS2* (e, e). a и e – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); δ и e – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «оPrl» (пёстрые боксы), * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (опе-way ANOVA; n = 12 в каждой из групп)



Рис. 6. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в длинноволновой области спектра, в сетчатке глаз самцов трёхиглой колюшки: *RH2* (a, δ), *LWS* (b, c). a и b – В условиях морской воды в контроле «К»(незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); δ и c – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «оРгl» (пестрые боксы). n = 12 в каждой из групп

полу [27-29]. Мы обнаружили различия в модификации экспрессии генов пролактинов в условиях пресноводной адаптации у самок и самцов. Ранее нами были обнаружены модификации пролактиновой оси колюшек в условиях пресноводной адаптации, различные у самок и самцов [17]. В этой связи влияние пресноводной адаптации, а также эффекты вводимого пролактина на сетчатку глаза описаны для самок и самцов по отдельности. Поскольку у самок, в отличие от самцов, экспрессия гена Prl1 в ткани мозга росла как при острой (24 ч), так и при хронической (72 ч) адаптации к пресной воде, мы предполагаем больший вклад пролактина-1 в адаптацию организма самок, но не самцов к пресноводным условиям (рис. 1, а и 4, а). Таким образом, пролактиновая ось самок трёхиглой колюшки стимулировалась при пресноводной адаптации сходным с другими видами рыб образом при исследованиях без разделения по полу (зебрафиш Danio rerio, мозамбикская тилапия Oreochromis mossambicus и серебристый горбыль Argyrosomus regius) [30-32]. Одновременно с этим и у самок, и у самцов мы

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

наблюдали снижение экспрессии гена Prl2 в мозге (рис. 1, δ и 4, δ). Следовательно, изменения экспрессии Prl1 (повышение) и Prl2 (снижение) в мозге самок трёхиглой колюшки были разнонаправленными в условиях как острой, так и хронической пресноводной адаптации, а в мозге самцов в этих условиях менялась только экспрессия Prl2 (снижение).

Известно, что оценку чувствительности цветового зрения можно проводить, измеряя соотношения экспрессии генов различных опсинов [3, 4]. Для проверки гипотезы о пролактинзависимом изменении чувствительности зрения в условиях пресноводной адаптации мы сравнили относительные уровни мРНК генов опсинов у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях острой и хронической пресноводной адаптации с введением им пролактина в условиях морской воды. Использованный овечий пролактин имитирует эффекты обоих пролактинов рыб, что было показано на тилапии O. mossambicus: оба пролактина тилапии, как и овечий пролактин, связывались пролактинчувствительными тканями [33].

Экспрессия гена SWS1 у самок трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации не находится под контролем пролактина, в отличие от самцов. Различный ответ пролактинов (Prl1 и Prl2) самок и самцов трёхиглой колюшки на острую и хроническую пресноводную адаптацию частично подтверждается отсутствием у самок и наличием у самцов пролактин-индуцированного ингибирования экспрессии гена SWS1, кодирующего коротковолновый опсин SWS1, чувствительный в ультрафиолетово-синей области спектра, в ткани сетчатки (рис. 2, δ и 5, δ). Что примечательно, в сетчатке глаза самок колюшек после острой адаптации к пресной воде экспрессия гена SWS1 повышалась, но в группе хронической адаптации этот показатель был на уровне, сопоставимом с контрольной группой. Введение пролактина не оказывало влияния на экспрессию гена SWS1 (рис. 2, а и б). Мы связываем подобный эффект с возможной регуляцией экспрессии опсина SWS1 в сетчатке глаз самок колюшек со стороны кортизола, являющегося ключевым гормоном острой пресноводной адаптации у рыб [31]. В ряде работ на млекопитающих описано влияние кортизола на большинство структур глаза, включая сетчатку и фоторецепторные клетки [34]. Однако подобное предположение требует дальнейшего более детального изучения. В сетчатке глаза самцов острая пресноводная адаптация сопровождалась снижением экспрессии гена SWS1, в отличие от самок, у которых наблюдалось повышение его экспрессии (рис. 2, а и 5, а). Изменение экспрессии гена SWS1 у самцов частично согласуется с литературными данными для общей популяции: по данным других исследователей экспрессия гена SWS1 в ткани сетчатки была выше у резидентных морских колюшек в сравнении с резидентными пресноводными [8]. Одновременно с этим при хронической пресноводной адаптации экспрессия гена SWS1 в сетчатке самцов колюшек не отличалась от таковой в контрольной группе. Поскольку эффект пресноводной адаптации на экспрессию данного гена наблюдается только в первые 24 ч, мы предполагаем его пролактиннезависимый характер в модели пресноводной адаптации и возможное влияние кортизола на экспрессию гена SWS1 у самцов. Несмотря на отсутствие эффекта 72-часовой пресноводной адаптации на экспрессию гена SWS1 в сетчатке глаза самцов колюшек, введение экзогенного пролактина в течение 72 ч приводило к её снижению (рис. 5, б). Подобный эффект может быть объяснён тем, что при переходе в пресную воду экспрессия генов Prl1 и Prl2 у самцов не повышалась, и, следовательно, в модели пресноводной адаптации отсутствие эффектов, оказываемых на сетчатку пролактином, может быть объяснено отсутствием увеличения пролактиновой регуляции сетчатки (рис. 4, a и δ). Таким образом, ген *SWS1*, кодирующий коротковолновый опсин SWS1, в сетчатке глаза регулируется пролактином у самцов, но не у самок трёхиглой колюшки.

Снижение экспрессии гена SWS2 у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации может индуцироваться пролактином. Экспрессия гена SWS2, кодирующего опсин, чувствительный в синей области спектра, в сетчатке глаза трёхиглой колюшки менялась схожим образом у самок и самцов как в модели пресноводной адаптации, так и после введения пролактина (рис. 2, в и г; 5, в и г). Как у самок, так и у самцов при острой и хронической пресноводной адаптации экспрессия гена SWS2 в сетчатке глаза снижалась. Аналогичный эффект оказало введение пролактина в условиях морской воды. Таким образом, можно с высокой долей вероятности утверждать, что снижение чувствительности цветового зрения самок и самцов трёхиглой колюшки к синей области спектра в условиях пресноводной адаптации опосредовано пролактином. Также нельзя исключать возможный эффект кортизола, который также классически ассоциируют с пресноводной адаптацией рыб [31]. Однако данное предположение требует более подробного изучения.

Повышение экспрессии генов *RH2* и *LWS* у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации не опосредовано пролактином. Экспрессия генов *RH2* и *LWS*, кодирующих длинноволновые опсины RH2 и LWS, чувствительные в зелёной и красной областях спектра соответственно, в сетчатке глаз самок трёхиглой колюшки повышалась при острой и хронической пресноводной адаптации (рис. 3, а и в), что говорит в пользу повышения чувствительности цветового зрения к длинноволновому излучению. Однако, поскольку этот эффект не воспроизводился при введении пролактина в условиях морской воды (рис. 3, б и г), мы предполагаем пролактиннезависимый характер изменения экспрессии данных опсинов. Изменение экспрессии данных опсинов при пресноводной адаптации может быть результатом влияния эстрогенов, для которых ранее был показан стимулирующий эффект на экспрессию RH2 и LWS в сетчатке обыкновенной гамбузии Gambusia affinis [11]. У самцов, в отличие от самок колюшек, экспрессия генов RH2 и LWS в сетчатке глаз не менялась при адаптации к пресной воде, и, как и у

самок, не менялась в условиях морской воды после введения пролактина (рис. 6). С одной стороны, это доказывает пролактиннезависимый характер регуляции длинноволновых опсинов у самок и самцов трёхиглой колюшки, с другой — может подтверждать гипотезу о возможном положительном влиянии эстрогенов на эти опсины у самок, но оставляет открытым вопрос об опосредованном половыми гормонами, а не пролактином, изменении цветового зрения рыб в условиях пресноводной адаптации.

Таким образом, цветовое зрение у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации меняется неодинаково. Для самок при хронической пресноводной адаптации показано пролактинзависимое снижение экспрессии гена SWS2 и пролактиннезависимое повышение экспрессии генов *RH2* и *LWS*. Сочетанное повышение чувствительности зрения самок к длинноволновой области спектра и снижение чувствительности в коротковолновой способствуют лучшему распознаванию красного и зелёного цвета, что может иметь ключевое значение для распознавания полового партнёра во время нереста. Изменение цветового зрения самцов при пресноводной адаптации сопряжено с уменьшением чувствительности в коротковолновой части спектра, опосредованным пролактинзависимым снижением экспрессии гена *SWS2*, в то время как экспрессия генов остальных опсинов не меняется. Тем не менее подобное изменение транскрипционной активности сетчатки самцов также может способствовать итоговому повышению чувствительности к длинноволновой части спектра.

Можно заключить, что адаптивные эффекты пролактина при пресноводных миграциях трёхиглой колюшки проявляются не только в регуляции водно-солевого обмена, но также цветового зрения, и они могут различаться у самок и самцов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300075-6 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00734).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Николаю Сергеевичу Мюге за плодотворное обсуждение данной работы.

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. Все процедуры были одобрены комиссией МГУ по биоэтике (№ протокола 98а; № собрания комиссии 108-о).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Nathans, J. (1989) The genes for color vision, *Sci. Am.*, **260**, 42-49.
- Fernald, R. D. (1993) Vision, in *The Physiology of Fishes* (Evans, D. H., ed.) CRC Press Inc, USA, Florida, pp. 161-189.
- Carleton, K. L., and Kocher, T. D. (2001) Cone opsin genes of African cichlid fishes: tuning spectral sensitivity by differential gene expression, *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1540-1550.
- Parry, J. W., Carleton, K. L., Spady, T., Carboo, A., Hunt, D. M., et al. (2005) Mix and match color vision: Tuning spectral sensitivity by differential opsin gene expression in Lake Malawi cichlids, *Curr. Biol.*, 15, 1734-1739.
- Cortesi, F., Mitchell, L. J., Tettamanti, V., Fogg, L. G., de Busserolles, F., et al. (2020) Visual system diversity in coral reef fishes, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **106**, 31-42.
 Terai, Y., Miyagi, R., Aibara, M., Mizoiri, S., Imai, H., (2017) 2017 2016
- Terai, Y., Miyagi, R., Aibara, M., Mizoiri, S., Imai, H., et al. (2017) Visual adaptation in Lake Victoria cichlid fishes: Depth-related variation of color and scotopic opsins in species from sand/mud bottoms, *BMC Evol. Biol.*, 17, 200.
- Fuller, R. C., Carleton, K. L., Fadool, J. M., Spady, T. C., and Travis, J. (2005) Genetic and environmental variation in the visual properties of bluefin killifish, *Lucania goodei*, *J. Evol. Biol.*, 18, 516-523.
 Rennison, D. J., Owens, G. L., Heckman, N., Schluter,
- Rennison, D. J., Owens, G. L., Heckman, N., Schluter, D., and Veen, T. (2016) Rapid adaptive evolution of colour vision in the threespine stickleback radiation, *Proc. Biol. Sci.*, 283, 20160242.

- 9. Butler, J. M., and Maruska, K. P. (2021) Opsin expression varies with Reproductive state in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni, Integr. Comp. Biol.*, **61**, 240-248.
- Shao, Y. T., Wang, F. Y., Fu, W. C., Yan, H. Y., Anraku, K., et al. (2014) Androgens increase lws opsin expression and red sensitivity in male three-spined sticklebacks, *PLoS One*, 9, e100330.
- Friesen, C. N., Ramsey, M. E., and Cummings, M. E. (2017) Differential sensitivity to estrogen-induced opsin expression in two poeciliid freshwater fish species, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 246, 200-210.
- Comp. Endocrinol., 246, 200-210.
 Yue, S., Wadia, V., Sekula, N., Dickinson, P. S., and Thompson, R. R. (2018) Acute effects of sex steroids on visual processing in male goldfish, J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol., 204, 17-29.
- 13. Bell, M. A., and Foster, S. A. (1994) Introduction to the evolutionary biology of the threespine stickleback, *Evol. Biol. Threespine Stickleback*, **1**, 27.
- Rennison, D. J., Owens, G. L., and Taylor, J. S. (2012) Opsin gene duplication and divergence in ray-finned fish, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 62, 986-1008.
- Mol. Phylogenet. Evol., 62, 986-1008.
 15. Flamarique, I. N., Cheng, C. L., Bergstrom, C., and Reimchen, T. E. (2013) Pronounced heritable variation and limited phenotypic plasticity in visual pigments and opsin expression of threespine stickleback photoreceptors, *J. Exp. Biol.*, 216, 656-667.
- J. Exp. Biol., 216, 656-667.
 16. Cortesi, F., Musilová, Z., Stieb, S. M., Hart, N. S., Siebeck, U. E., et al. (2015) Ancestral duplications and

highly dynamic opsin gene evolution in percomorph fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1493-1498.

- Pavlova, N. S., Neretina, T. V., and Smirnova, O. V. (2020) Dynamics of prolactin axis genes in the brain of male and female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Gasterostaidae) during short-term freshwater adaptation, *J. Ichthyol.*, **60**, 299-304.
- Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., et al. (2015) Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 846, 83-95.
- 19. Thébault, S. (2017) Potential mechanisms behind the antioxidant actions of prolactin in the retina, *Exp. Eye Res.*, **160**, 56-61.
- Huang, X., Hui, M. N., Liu, Y., Yuen, D. S., Zhang, Y., et al. (2009) Discovery of a novel prolactin in non-mammalian vertebrates: evolutionary perspectives and its involvement in teleost retina development, *PLoS One*, 4, e6163.
 Inokuchi, M., Breves, J. P., Moriyama, S., Watanabe, S.,
- Inokuchi, M., Breves, J. P., Moriyama, S., Watanabe, S., Kaneko, T., et al. (2015) Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 309, R1251-R1263.
- Bollinger, R. J., Ellis, L. V., Bossus, M. C., and Tipsmark, C. K. (2018) Prolactin controls Na⁺,Cl⁻ cotransporter via Stat5 pathway in the teleost gill, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 477, 163-171.
- Franco-Belussi, L., De Oliveira, C., and Sköld, H. N. (2018) Regulation of eye and jaw colouration in threespined stickleback *Gasterosteus aculeatus*, J. Fish Biol., 92, 1788-1804.
- Pierce, A. L., Fox, B. K., Davis, L. K., Visitacion, N., Kitahashi, T., et al. (2007) Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **154**, 31-40.
- 25. Hibbeler, S., Scharsack, J. P., and Becker, S. (2008) Housekeeping genes for quantitative expression studies in

the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*, *BMC Mol. Biol.*, **9**, 18.

- Dalton, B. E., Lu, J., Leips, J., Cronin, T. W., and Carleton, K. L. (2015) Variable light environments induce plastic spectral tuning by regional opsin coexpression in the African cichlid fish, Metriaclima zebra, *Mol. Ecol.*, 24, 4193-4204.
- Manzon L. A. (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: A review, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **125**, 291-310.
- Lee, K. M., Kaneko, T., Katoh, F., and Aida, K. (2006) Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu *Takifugu rubripes* exposed to a hypoosmotic environment, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **149**, 285-293.
- 29. Sakamoto, T., and McCormick, S. D. (2006) Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **147**, 24-30.
- Shu, Y., Lou, Q., Dai, Z., Dai, X., He, J., et al. (2016) The basal function of teleost prolactin as a key regulator on ion uptake identified with zebrafish knockout models, *Sci. Rep.*, 6, 18597.
- 31. Watanabe, S., Itoh, K., and Kaneko, T. (2016) Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: exploring with an improved gill incubation system, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 232, 151-159.
- *Endocrinol.*, 232, 151-159.
 32. Mohammed-Geba, K., González, A. A., Suárez, R. A., Galal-Khallaf, A., Martos-Sitcha, J. A., et al. (2017) Molecular performance of Prl and Gh/Igfl axis in the Mediterranean meager, *Argyrosomus regius*, acclimated to different rearing salinities, *Fish Physiol. Biochem.*, 43, 203-216.
- Dauder, S., Young, G., and Bern, H. A. (1990) Effect of hypophysectomy, replacement therapy with ovine prolactin, and cortisol and triiodothyronine treatment on prolactin receptors of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77, 378-385.
- Sulaiman, R. S., Kadmiel, M., and Cidlowski, J. A. (2018) Glucocorticoid receptor signaling in the eye, *Steroids*, 133, 60-66.

OPSINE GENES EXPRESSION IN EYE RETINA OF FEMALE AND MALE THREESPINED STICKLEBACKS *Gasterosteus aculeatus* L. DEPENDS ON FRESHWATER ADAPTATION AND PROLACTIN

N. S. Pavlova^{1*}, A. R. Gizatulina², T. V. Neretina³, and O. V. Smirnova¹

¹ Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: pav.nad.ser@gmail.com

² Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Pertsov White Sea Biological Station, Moscow State University, 186671 poselok Seaside, Loukhsky District, Republic Karelia, Russia

Color vision sensitivity is crucial for fish adaptation during migration and reproduction. Prolactin and prolactinlike hormone are important hormonal regulators in both these processes. We hypothesized that prolactin might influence color vision sensitivity during freshwater migrations in fish. We studied the effects of prolactin and freshwater adaptation during spawning period on opsin gene expression (*SWS1*, *SWS2*, *RH2*, *LWS*) in the retina of female and male threespined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L. Prolactin gene expression elevates in the brain of female, but not male, and prolactinlike hormone gene expression decreases in the brain of both male and female sticklebacks during freshwater adaptation. Opsin *SWS2* gene expression decreases in female and male retina during freshwater adaptation and after prolactin administration. In the retina of male sticklebacks opsin *SWS1* gene expression decreases after prolactin administration but not freshwater adaptation. Opsins RH2 and LWS gene expression did not depend on prolactin administration in male and female sticklebacks. We conclude that some opsin genes retinal expression is regulated by prolactin in sticklebacks and could depend on sex and freshwater adaptation. This expands the knowledge of adaptive effects of prolactin on fish during freshwater migrations.

Keywords: prolactin, opsins, threespined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L., freshwater adaptation, color vision adaptation, sex dependant effects

УДК 577.24;577.217;577.25

В ФОКУСЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФУНКЦИИ АНТИВОЗРАСТНОЙ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ SIRT3

© 2022 Jarmila Nahálková

Biochemistry, Molecular, and Cell Biology Unit, Biochemworld Co., 74394 Skyttorp, Uppsala County, Sweden; e-mail: jarmila.nahalkova@biochemworld.net

> Поступила в редакцию 11.11.2021 После доработки 20.12.2021 Принята к публикации 22.12.2021

Белок сиртуин 3 (SIRT3) представляет собой лизиндеацетилазу, играющую важную роль в поддержании целостности митохондрий, являющихся уязвимой мишенью при многих заболеваниях. Интересно, что клеточное старение может быть обращено только лишь путём суперэкспрессии SIRT3, что вызывает много вопросов о роли SIRT3 в молекулярных механизмах борьбы со старением. Анализ функционирования SIRT3 мы провели на основе имеющихся данных по взаимодействию 407 субстратов этого белка. Результаты изучения многообразия путей и прогнозирования функций генов подтвердили роль SIRT3 в первичном метаболизме и производстве АТР митохондриями. Кроме того, SIRT3, предположительно, задействован в термогенезе, при развитии дегенеративных заболеваний головного мозга, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, а также неалкогольной жировой болезни печени. Приоритизация белков в узлах исследуемого пути продемонстрировала, что субъединицы комплекса I дыхательной цепи митохондрий (MRC) являются основными регуляторными точками во всей сети взаимодействий. Дополнительными приоритетными узлами оказались субъединица сукцинатдегидрогеназы В (SDHB) комплекса II и ATP5F1 комплекса V MRC. Проведенный анализ подтверждает существование NADH/NAD+-зависимой регуляторной петли обратной связи между SIRT3, комплексом I MRC и ацетил-КоА-синтетазами, а также наличие ядерных субстратов SIRT3. Малоисследованные функции субстратов SIRT3, таких как LMNA и LMNB, HIF-1a, p53, DNA-PK и PARK7, отмечены как перспективные для дальнейших научных исследований. SIRT3 действует как репрессор BACE1 через SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (SIRT3-BACE1), функции которого наилучшим образом соответствуют механизмам циркадного ритма. Формируется новая рабочая гипотеза терапевтической мишени для лечения болезни Альцгеймера. Также обозначены другие важные пути терапевтических вмешательств, ассоциированные с активностью SIRT3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SIRT3, NAD⁺-зависимая деацетилаза, сеть белковых взаимодействий, анализ обогащения путей, старение, дыхательная цепь транспорта электронов, митохондрии, возрастные заболевания. DOI: 10.31857/S0320972522020105

ВВЕДЕНИЕ

Обращение вспять процесса старения или, по крайней мере, его отсрочка — очень амбициозная задача для многих поколений ученых. С точки зрения общественного здравоохранения, желаемым результатом была бы не возможность продления общей продолжительности жизни человека, а сохранение здоровья людей пожилого возраста.

Семейство белков-сиртуинов известно благодаря его функциональной связи со старением и возрастными заболеваниями, а также особым свойствам сиртуина 3 (SIRT3), NAD⁺-зависимой лизиндеацетилазы, играющей важную роль в защите целостности митохондрий. Эксперименты на SIRT3-нокаутных (SIRT3 KO) мышах продемонстрировали гиперацетилирование большинства митохондриальных белков этих мышей, тем самым подтверждая роль SIRT3 как основной митохондриальной деацетилазы [1]. Нокаутные по SIRT3 мыши демонстрируют потенциальную активность этого белка в контексте возрастных заболеваний, поскольку у этих животных развивается целый ряд болезней, включая рак, нейродегенеративные и сердечнососудистые заболевания, а также нарушения метаболизма [2]. Такие мыши демонстрируют изменения энергетики митохондрий и синтеза АТР, сопровождающиеся повышенным ацетилированием митохондриальных белков, вклю-

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; БХ – болезнь Хантингтона; НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; ТБЖ – ткань бурого жира; цикл ТСА – цикл трикарбоновых кислот; АРР – предшественник бета-амилоида; ВАСЕ1 – бета-секретаза 1; СС – циркадные часы (circadian clock); СR – ограничение калорий (calorie restriction); LMNA – ламин A/C; MRC – дыхательная цепь митохондрий; NHEJ – негомологичное соединение концов; ОХРНОЅ – окислительное фосфорилирование; PDH – пируватдегидрогеназа; ROS – активные формы кислорода; wt – дикий тип.

чая Мп-зависимую супероксиддисмутазу, которая в таком состоянии теряет способность защищать от возросшего количества активных форм кислорода (ROS). Этот процесс в конечном счете приводит к канцерогенезу, и, таким образом, SIRT3 действует как опухолевый супрессор, поскольку его отсутствие запускает онкогенез [3]. SIRT3 играет решающую роль в регулировании биоэнергетики митохондрий, которая активируется питательными веществами и физическими упражнениями [4]. Уровень экспрессии сиртуина 3 снижается в сенесцентных стволовых клетках человека (HSC-s) [5], в клетках лобных долей и гиппокампе старых крыс [6]. Интересно, что старение клеток HSC может быть обращено только лишь путем сверхэкспрессии SIRT3, что свидетельствует о важной роли этого белка в клеточных механизмах борьбы со старением [5]. SIRT3 также действует как нейропротектор, защищая митохондрии путем подавления продукции ROS, предотвращая снижение мембранного потенциала в митохондриях, а также выступая в роли сенсора нейротоксических воздействий в моделях болезни Альцгеймера (БА) на крысах и в тканях головного мозга при БА [7].

Для изучения молекулярного механизма действия SIRT3 в процессе старения в настоящей работе исследуются взаимодействия SIRT3 с его субстратами. При анализе мы использовали предположение, что прямые взаимодействия белок-белок говорят об их участии в одних и тех же заболеваниях, и что взаимодействующие белки с высокой степенью достоверности участвуют в идентичных клеточных и молекулярных реакциях [8]. В работе мы использовали анализ обогащения молекулярных путей с использованием сервиса GeneMania, работающего в среде Cytoscape, который был дополнен онлайн-анализом STRING. С помощью приложений CytoHubba и CODE мы определили высокоприоритетные белковые комплексы (узлы пути) и кластеры с основными регуляторными функциями. Результаты анализа обсуждаются в рамках антивозрастных функций фермента и его роли в работе митохондрий при возрастных заболеваниях. Активность SIRT3 в качестве репрессора бета-секретазы 1 (ВАСЕ1) посредством пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-ВАСЕ1 (SIRT3-BACE1) позволила сформировать новую рабочую гипотезу касательно регуляции ВАСЕ1, которая является одной из основных терапевтических мишеней при БА. Наиболее важные сигнальные и метаболические пути, связанные с активностью SIRT3. выделены в настоящей работе с целью дальнейших исследований способов регулирования ее активности и разработки терапевтических вмешательств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Список субстратов SIRT3. Субстраты SIRT3 были подобраны из литературных источников [4, 9–29], которые, в частности, включали крупномасштабные протеомные исследования [30-32] (табл. S1 и S2 в Приложении). В одном из исследований были выявлены дифференциально ацетилированные митохондриальные белки, выделенные из печени мышей дикого типа (wt) и нокаутных по SIRT3 мышей (SIRT3 KO) с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ/МС). Для анализа были отобраны субстраты SIRT3 с двукратным повышением уровня ацетилирования у мышей SIRT3 КО по сравнению с мышами дикого типа (p = 0,01) [30]. Затем была использована наносистема ЖХ/МС с обращенной фазой для идентификации субстратов SIRT3 из митохондриального ацетилома печени мышей дикого типа и SIRT3 КО. Для дальнейшего анализа были выбраны белки с минимум 2-кратным повышением уровня ацетилирования в SIRT3 КО мышах по сравнению с мышами дикого типа (*t*-критерий Уэлча с поправкой Стори < 0,01) [31]. Наконец, были включены субстраты из исследований SILAC по дифференциальному ацетилированию белков SIRT3 КО мышей и эмбриональных фибробластов wt мышей, а также клетки U2OS с ретровирусной гиперэкспрессией SIRT3 в сравнении с клетками с сайленсингом SIRT3 с использованием shRNA (короткие шпилечные РНК). Дифференциальным порогом было установлено 2-кратное изменение уровня ацетилирования ДЛЯ отношений SIRT3 KO/wt и SIRT3 KO/SIRT3 [32]. В окончательный список субстратов SIRT3, использованных для анализа, вошли 407 белков (табл. S2 в Приложении).

Анализ GeneMania. Названия белковсубстратов SIRT3 были заменены на совместимые с GeneMania идентификаторы с использованием баз данных UniprotKB [33] и OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man®) [34]. Анализ с использованием GeneMania (3.5.2) [35-37] был выполнен в среде Сутосаре (3.7.2) [38] при помощи преобразованного списка идентификаторов субстратов SIRT3, в качестве запроса был введен SIRT3 (табл. S2 в Приложении). В анализе использовали базу данных для *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) с включением всех типов взаимодействий. Целью поиска было выявление 20 основных ассоциированных генов и максимум 20 характерных признаков с использованием GO Molecular function weighting. Этот метод был выбран на основе высокой вероятности совпадения молекулярных функций у субстратов SIRT3, поскольку в сети 408 белков (включая SIRT3) было выявлено 1230 белок-белковых взаимодействий [8]. Категория результатов «Consolidated pathways» («Консолидированные пути») представляет собой результат анализа обогащения путей, который в дальнейшем будет использован в обсуждении.

STRING-анализ (v. 11) [39] был выполнен онлайн с использованием списка субстратов SIRT3 (табл. S2 в Приложении) в качестве запроса по множеству белков в базе данных *H. sapi*ens. Использовались следующие настройки: источники поиска активных взаимодействий текстовый анализ, эксперименты и базы данных; минимальный уровень оценки взаимодействия – наивысшая вероятность (0,9); максимальное число взаимодействий, определяющих 1-ю и 2-ю границы – нет. Результаты анализа функционального обогащения были экспортированы со значением False Discovery Rate (FDR), меньшим или равным 0,05. Сеть взаимодействия была сгруппирована по методу кластеризации Markov Cluster Algorithm (MCL) [40] с инфляционным значением, равным 10.

Приоритизация белковых узлов. Высокоприоритетные белковые узлы и пути в сети субстратных взаимодействий SIRT3, построенной GeneMania, были предсказаны с использованием CytoHubba (0.1) [41]. Приложение было создано для использования топологического метода Maximum click centrality (MCC), который, по мнению разработчиков, обеспечивает наивысшую точность в предсказании комплексов с максимальным приоритетом [41]. Согласно выбранным настройкам, проводился поиск комплексов первой ступени и демонстрация кратчайшего пути. Комплексы первой ступени представляют собой белковые узлы, взаимодействующие непосредственно с искомыми белка-МИ.

Кластерный анализ. Кластеры белковых комплексов, демонстрирующие высокую степень взаимодействия, и которые с большой вероятностью представляют собой функциональные комплексы, были определены с помощью приложения MCODE к Cytoscape (v. 1.6) [42]. Для анализа были использованы следующие программные настройки: Network scoring – Degree Cutoff: 2; Cluster finding – Haircut; Node score cutoff: 0.2; K-Core: 2; Max. Depth: 100.

Визуализация путей. Визуализация путей была осуществлена с помощью базы знаний приложения WikiPathways [43], работающего в среде Суtoscape (3.9.0) [38], а также с использованием ссылок на литературу, упомянутых в тексте. Рисунок был создан с помощью Adobe Illustrator 2020 (24.2.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы исследовали антивозрастные функции основного митохондриального белка, деацетилазы SIRT3, в контексте потенциальных терапевтических вмешательств. Основная цель состояла в разработке рабочей гипотезы, основанной на анализе больших данных, которая в дальнейшем может быть использована в экспериментальных исследованиях, связанных со старением.

Антивозрастная функция SIRT3 была продемонстрирована на HSC-s, в которых указанный белок способствует выживанию клеток в условиях окислительного стресса и омоложению фенотипа [5]. В молодых клетках уровень экспрессии SIRT3 является высоким, однако он снижается со старением клеток и тканей, что приводит к повышению уровня ROS и окислительным повреждениям [6, 44]. Мыши SIRT3 КО демонстрируют значительный спектр заболеваний, ассоциированных со старением [2]. Ввиду упомянутого антивозрастного эффекта SIRT3 [5], фармакологическая активация его экспрессии и регуляция функционально связанных путей являются очень востребованными в контексте разработки антивозрастной терапии.

В настоящей работе исследуются взаимодействия в сети белковых субстратов SIRT3, для чего был применен анализ функционального обогащения, предсказание функции белка, приоритизация белковых узлов и методы кластеризации (рис. 1 и 2, табл. 1). Анализ сети взаимодействий применяется для выявления наиболее важных молекулярных функций, ассоциированных с деацетилирующей активностью SIRT3. Использование искусственного интеллекта особенно полезно для извлечения информации из ограниченных литературных источников, которая может ускользнуть от внимания при рутинном анализе данных. На основе полученной информации могут быть выдвинуты новые гипотезы и сделаны выводы, потенциально имеющие значение в дальнейших экспериментальных исследованиях.

Приоритизация белковых узлов проводится с целью выявления белковых узлов и кластеров в сети взаимодействия, имеющих важные регуляторные роли. Внимание также уделяется субклеточной локализации субстратов SIRT3, что важно при интерпретации функционала SIRT3 в различных клеточных компартментах. Также была построена модель регуляции уровня BACE1 путем активации SIRT3, которая может быть использована при исследовании потенциальной терапии при БА.

Система взаимодействия SIRT3-субстрат. В настоящей работе используется приложение



Рис. 1. Анализ обогащения путей в сети взаимодействия субстратов SIRT3, выполненный с использованием приложения STRING. *a* – Пути KEGG; *b* – GO категория «клеточные компоненты». Анализ был выполнен с использованием списка субстратов SIRT3 в качестве множественного запроса по базе данных *H. sapiens*

GeneMania в среде Cytoscape, аналитический инструмент для исследования обогащения и прогнозирования функций генов, основанный на объединенных геномных и протеомных данных, а также данных по экспрессии мРНК [35, 36, 45].

Программа позволяет провести сопоставление проверяемых субстратов с предсказанными и экспериментально подтвержденными физическими белок-белковыми взаимодействиями, генетическими взаимодействиями, результатами исследований по колокализации и коэкспрессии. Наконец, она подходит для известных сигнальных и метаболических сетей. Одним из преимуществ приложения GeneMania является его интеграция со средой Суtoscape, которая позволяет эффективно конструировать сети взаимодействий. База данных GeneMania постоянно обновляется и пополняется новой информацией [37], что не всегда происходит с другими типами платформ по анализу взаимодействий в путях.

Результаты GeneMania соответствовали известным наиболее важным функциям системы взаимодействия субстратов с SIRT3, которые связаны с дыхательной цепью переноса электронов; основными метаболическими путями; метаболизмом жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел; в то же время ассоциация с болезнью Альцгеймера и Хантингтона

имела более низкий ранг (табл. 1). Дополнительно была проведена приоритизация белковых узлов с помощью CytoHubba. Субъединицы NADH:убихинон оксидоредуктазы, представляющие комплекс I дыхательной цепи митохондрий (MRC), были определены как узлы с наивысшим рангом (рис. 2). Это говорит о критической важности их роли в регулировании взаимодействий SIRT3 и его субстратов (табл. 1). Также высокий ранг был присвоен субъединице В сукцинатдегидрогеназы (SDHB) комплекса II, а также ATPF1, кодирующему субъединицу В АТР-синтазы F0 в комплексе V MRC. Кластерный анализ с применением MCODE выявил среди наиболее важных групп приоритетную подсистему из 70 узлов, участвующих в окислительном фосфорилировании (OXPHOS), в дыхательной цепи переноса электронов, а также ассоциированную с развитием БА и болезни Хантингтона (БХ) (данные не показаны); указанная подсистема определяет основные регуляторные узлы в общей системе взаимодействий пути.

Анализ GeneMania был в дальнейшем дополнен при использовании анализа функционального обогащения с применением онлайн базы данных STRING, что привело к получению прочно связанной сети белок-белковых взаимодействия субстратов SIRT3 (рис. 1). Алгоритм дополняет базу данных о белках-субстратах SIRT3, используя данные об известных взаимо-

Таблица 1. Результат анализа обогащения путей и прогнозирования функции гена в сети взаимодействия субстратов SIRT3 с использованием приложения GeneMania в среде Cytoscape (3.7.2). Анализ был проведен с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) с включением всех типов взаимодействий

Консолидированный путь		Описание базы данных
Дыхательная цепь переноса электронов	19,38	Reactome React 22393.2 дыхательная цепь переноса электронов
Метаболические пути		KEGG hsa01100 метаболические пути
Метаболизм жирных кислот, триацилглице- ридов и кетоновых тел		Reactome React 22279.2 метаболизм жирных кислот, триацил- глицеридов и кетоновых тел
Окислительное фосфорилирование	4,93	KEGG hsa00190 окислительное фосфорилирование
Метаболизм	2,54	Reactome React 111217.2 метаболизм
Метаболизм жирных кислот	2,33	KEGG hsa00071 метаболизм жирных кислот
Болезнь Альцгеймера	1,23	KEGG hsa05010 болезнь Альцгеймера
Метаболизм аминокислот и их производных	0,44	Reactome React 13.4 метаболизм аминокислот и их производных
Болезнь Хантингтона	0,13	КЕGG hsa05016 болезнь Хантингтона

Примечание. Анализ был проведен с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) и включением всех типов взаимодействий.

* Ранг (вес) показывает прогностическую ценность, присвоенную GeneMania в отношении того, насколько указанные пути соответствуют набору данных, указанных в запросе, по сравнению другими данными (вне запроса).

действиях, полученные из открытых источников и с помощью вычислительных прогнозов. Система также выполняет дополнительную классификацию на основе Gene Ontology, KEGG, высокопроизводительного поиска в текстовых данных и иерархической кластеризации системы [39, 46, 47], что может быть полезно в контексте исследований по разным биологическим вопросам.

Кластеризуя данные с использованием метода MCL мы дополнили результаты STRING с учетом классификации путей KEGG и продемонстрировали связь субстратов SIRT3 с болезнью Паркинсона (БП), БХ, БА и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) (рис. 1, *a*) [40, 48]. Высокий уровень экспрессии SIRT3 в метаболически активных тканях, таких как мозг, печень, сердце и ткань бурого жира (ТБЖ), коррелирует с его функциональной ролью в развитии нейродегенеративных заболеваний, НАЖБП и в процессе термогенеза (рис. 1, *a*) [1].

Система взаимодействий на основе классификации путей KEGG и их кластеризации при использовании MCL (рис. 1, a) демонстрировала разделение на 5 кластеров, коррелирующих субклеточной локализацией субстратов С SIRT3 (рис. 1, *b*). Кластер I содержит субстраты SIRT3, связанные с ОХРНОЅ, БА, БП, БХ и НАЖБП (рис.1, а). Он состоит из субъединиц NADH:убихинон оксидоредуктазы (комплекс I), фермента, который осуществляет перенос электронов от NADH к убихинону, части дыхательной переноса электронов цепи (рис. 1, a). Активность комплекса I ингибируется у мышей SIRT3 KO, в то время как влияние SIRT3 может восстанавливать его активность, что обусловлено деацетилазной активностью SIRT3. Нарушение продукции АТР составляет более 50% у мышей SIRT3 КО и ~30% – в выделенных клетках эмбриональных фибробластов мыши (MEF) [49]. Указанные результаты согласуются с данными настоящей работы: SIRT3 деацетилирует различные субъединицы комплексов I, II и даже комплекса V MRC (кластер I и II, рис. 1, a), которые совпадают с приоритетными субстратами системы, построенной при помощи GeneMania (рис. 2). Однако, по-видимому, регуляция митохондриальной активности SIRT3 лишь частично обусловлена деацетилазной активностью этого фермента, поскольку его нокаут не снижает уровень клеточного АТР до нуля. Настоящий анализ подтверждает существование регулируемой NADH/NAD⁺ петли обратной связи между SIRT3, комплексом I MRC и ацетил-КоА-синтетазами [49]. SIRT3 требует для своей активности NAD⁺, генерируемого комплексом I MRC, который, в свою очередь, акти-



Рис. 2. Приоритизация белковых узлов в сети взаимодействия субстратов SIRT3, предсказанная с использованием СуtoHubba (0.1). Сеть была создана с применением приложения GeneMania (3.5.2) в среде Суtoscape (3.7.2) с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) с включением только физических взаимодействий. Ранги узлов обозначены цветом от самого высокого (красный) до низкого (желтый)

вируется деацетилазой SIRT3 и создает регулируемый цикл обратной связи [49]. Примечательно, что SIRT3 и другие сиртуины также активируют путем деацетилирования ряд ацетил-КоАсинтетаз [10] (табл. S2 в Приложении, колонки 24–32), которые являются донорами ацетила для ацетилирования белка, включая комплексы I, II и V MRC и поставщиков ацетил-КоА. Что касается этой функции, SIRT3 превосходит другие сиртуины по деацетилированию ACSS2 [10] и индуцирует дополнительную выработку энергии митохондриями, контролируя синтез ацетил-КоА. Один из субстратов ACSS2 превращает ацетат и жирные кислоты в ацетил-КоА, в основном используемый для окисления в цикле трикарбоновых кислот (ТСА, цикл Кребса), и, таким образом, вносит значительный вклад в производство NADH и ATP [50]. NADH дополнительно используется комплексом I MRC для создания протонного градиента для АТР-синтазы и NAD⁺, который замыкает регуляторный цикл. Анализ приоритизации в системе взаимодействий подтвердил в высшей степени значимую роль механизмов, связанных с активностью деацетилазы SIRT3, оказывающей наибольшее влияние на клеточную энергетику.

Кластер также включает субъединицы комплекса сукцинатдегидрогеназы, субъединицу А

(SDHA) и субъединицу В (SDHB), комплекс II MRC. Результаты настоящей работы согласуются с результатом процессирования сиртуином 3 субъединиц комплекса II, предложенным некоторыми авторами [51]. Физическое взаимодействие SIRT3 и SDHB было также продемонстрировано в двух других независимых экспериментах, однако без обнаружения специфических сайтов ацетилирования [52]. В другой работе сообщается, что деацетилирование SDHA SIRT3 оказывает лишь ограниченное стимулирующее действие на активность всего комплекса II [53], либо оно вообще отсутствует [49]. Упомянутая ограниченность в регуляция путем ацетилирования все же имеет смысл, потому что комплекс II MRC является важным ферментативным комплексом, и полная его инактивация является летальной [53].

Кластер II включает субстраты, ассоциированные с БА, БП и БХ, которые также играют роль в процессах термогенеза и OXPHOS (рис. 1, а). Кластер состоит из субъединиц АТР-синтазы (комплекс V), последнего фермента в цепи окислительного фосфорилирования митохондрий, который производит клеточную энергию в форме АТР путем хемиосмотического выброса протонов. Повышенное ацетилирование субъединиц фермента происходит в митохондриях печени и мышц SIRT3 КО мышей, когда у животных наблюдается недостаточная выработка митохондриального АТР [4]. Это указывает на то, что SIRT3 деацетилирует и фактически регулирует активность комплекса V MRC. С другой стороны, SIRT3, стимулируемый питательными веществами, ограничением калорий (CR) и физическими упражнениями, деацетилирует субъединицы АТР-синтазы a, b, c, d и OSCP, что приводит к увеличению энергоснабжения митохондрий и антивозрастным эффектам [4]. Поразительно, что SIRT3 необходим для поддержания мембранного потенциала здоровых митохондрий, где он связан с АТР-синтазой через уровень рН и стресса [54]. Связь между SIRT3 и ATP5O может быть нарушена при изменении потенциала внутренней митохондриальной мембраны, но не при ингибировании активности АТР-синтазы при синтезе АТР. Вместо этого АТР5О является одним из субстратов SIRT3 (табл. S2 в Приложении) и, как и в случае других субъединиц АТР-синтазы (табл. 2, строки 59-68), его активность регулируется посредством деацетилирования SIRT3, что позволяет предположить, что связывание опосредовано взаимодействиями ферментсубстрат. Мембранный потенциал митохондрий зависит от SIRT3, поскольку после его падения он быстро восстанавливается в клетках wt HeLa,

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

но не в клетках SIRT3 КО [54]. Субъединица ATP5F1 является одним из приоритетных узлов в системе взаимодействия SIRT3-субстрат (рис. 2), которая, параллельно с деацетилированием других субъединиц комплекса V MRC, демонстрирует важнейшую роль в биоэнергетике митохондрий.

Кластер III состоит из ферментов, участвующих в цикле трикарбоновых кислот, не связанных в сети через STRING ни с одной из основных болезней (рис. 1, *a*), однако имеющих большое значение в развитии онкологических заболеваний и БА. Метаболизм глюкозы в мозге сильно нарушается при БА, причем ферменты цикла ТСА с максимальным снижением уровня стоят выше (upstream) от сукцинил-КоА в метаболическом пути [55]. PDHX, PDHB, PDHA1 (рис. 1, *a*, кластер III) являются субъединицами ферментативного комплекса пируватдегидрогеназы (PDHC), который участвует в первой и необратимой ферментативной реакции на стадии, соединяющей гликолитический цикл и ТСА, превращая пируват в ацетил-КоА. SIRT3 активирует субъединицу фермента PDHA1 путем ее деацетилирования, что имеет важное значение для регуляции эффекта Варбурга в раковых клетках [56, 57]. Отложения бета-амилоида (Аβ) в мозге при БА вызывают повышенное фосфорилирование PDHC, приводящее к снижению продукции энергии из-за смены режима метаболизма, а именно, перехода от OXPHOS к гликолизу. В связи с этим ограничением в метаболизме альтернативная энергия вырабатывается путем обратной ферментативной реакции, превращающей оксалоацетат в сукцинат, и с помощью цепи переноса электронов в комплексе I [58]. Ассоциированная с возрастом стимуляция киназы пируватдегидрогеназы (PDK) инактивирует PDHC посредством ее фосфорилирования, и возникающий в результате дефицит продукции АТР приводит к повреждению митохондрий и ухудшению функции синапсов [59]. Поскольку экспрессия SIRT3 имеет тенденцию к снижению в стареющих клетках и тканях [5, 6], то старение связано со снижением выработки митохондриальной АТР из-за снижения активности OXPHOS.

Кластер IV образован субстратами SIRT3, участвующими в распаде жирных кислот и в метаболизме аминокислот с разветвленной цепью (рис. 1, *a*). Повышенное ацетилирование пируватдегидрогеназы у мышей SIRT3 КО приводит к метаболическому переключению за счет повышенного окисления жирных кислот и накопления лактата в мышцах [24]. Это также вызывает гиперацетилирование длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, что приводит к накоплению длинноцепочечных жирных кислот как промежуточных продуктов метаболизма [20]. Это говорит о том, что активность деацетилирования SIRT3 оказывает более широкое регулирующее действие, включая не только метаболизм глюкозы, но и метаболизм жирных кислот и разветвленных аминокислот.

Субклеточная локализация SIRT3 и его субстратов. При том, что в основном деацетилаза описывается как митохондриальный белок, существуют разногласия по поводу субклеточного расположения SIRT3 в других компартментах. Согласно некоторым сообщениям, SIRT3 перемещается между ядром и митохондриями при воздействии клеточного стресса или сверхэкспрессии. Прежде чем он будет экспортирован в митохондрии, SIRT3 подвергается *N*-концевому отщеплению 142 аминокислотных остатков [60]. Ядерная локализация SIRT3, однако, ранее подвергалась сомнению некоторыми авторами, поскольку деацетилаза, согласно их экспериментам, является исключительно митохондриальным ферментом [61, 62].

Чтобы оценить локализацию внутриклеточной активности SIRT3, данные STRING о сети взаимодействия субстратов SIRT3 классифицировали с помощью GO категории «клеточный компартмент». Результаты продемонстрировали четыре основных субклеточных компартмента в качестве мест расположения субстратов SIRT3. Ими были ядро, митохондрии, цитоплазма и пероксисомы (рис. 1, b). Большинство субстратов SIRT3 были также локализованы в цитоплазме (данные не показаны), за исключением гистоновых белков. Субстраты SIRT3, используемые для анализа данных, были получены в результате анализа митохондриальных фракций [30, 31], где, соответственно, митохондриальные белки представлены в больших количествах. Исключением является исследование SILAC [32] (табл. S1 в Приложении), в котором лизировали цельные клетки и исследовали методами ЖХ/МС. Список субстратов SIRT3, полученный в результате этого исследования, содержит множество гистоновых белков (рис. 1, b), в то время как их присутствие в списках субстратов из других источников [30, 31] ограничено.

Интересно, что кластеры I и II (рис. 1, *b*) содержат как митохондриальные, так и ядерные субстраты SIRT3. Субъединицы дыхательной цепи переноса электронов комплекса I (NDUFS1–3, NDUFS6), субъединица 9 ацил-КоА дегидрогеназы (ACAD9) и NDUFAB1 расположены как в митохондриях, так и в нуклеоплазме. Субъединица В периферической мембраны ATP-синтазы (ATP5F1) также локализована в нуклеоплазме, митохондриальной мембране и митохондриальном матриксе (рис. 1, *b*). PNPT1 участвует в производстве митохондриальной мPHK, а полиаденилирование проходит в митохондриальных рибосомах и митохондриальной оболочке [63]. SLC25A13, митохондриальный переносчик кальция, локализующийся в митохондриальном матриксе и митохондриальном нуклеоиде, транспортирует цитоплазматический глутамат через внутреннюю митохондриальную мембрану для создания источника митохондриального аспартата [64] (рис. 1, *b*).

Кластер III включает митохондриальные белки, кодируемые в ядре и локализованные в различных митохондриальных компартментах (рис. 1, b). Субстраты SIRT3 GFM1, GFM2 и TSFM, включенные в эти кластеры, являются митохондриальными факторами элонгации, важными для трансляции белка в митохондриях, и они локализованы в митохондриальном матриксе. Их мутации являются причиной митохондриальных заболеваний, вызванных дефицитом MRC [65–67]. Другой фактор элонгации трансляции, TUFM, локализован как в матриксе, так и в нуклеоидах митохондрий (рис. 1, b) [68]. Было продемонстрировано, что SIRT3 регулирует трансляционную активность митохондриальных рибосом [19]. Митохондриальные рибосомные белки MRPL10, MRPL11, MRPL45, MRPL46, MRPL12, MRPS22, MRPS26, MRPS30 и MRPS9, входящие в этот кластер, кодируются ядерной ДНК.

Кластер IV содержит ядерные гистоновые белки и несколько белков нуклеоплазмы (рис. 1, *b*). Ферментативно активный SIRT3 выполняет функцию сайленсинга путем деацетилирования H4K16Ac, H3K9Ac [60] и H3K56Ac [69], что также свидетельствует в пользу наличия активного SIRT3 в ядре. Интересно, что совместная экспрессия SIRT3 и SIRT5 приводит к его перемещению из митохондрий в ядро [70]. Среди сиртуинов SIRT3 обладает наилучшей способностью к освобождению β -гидроксибутирила (bhb) от ядерного субстрата H3K9bhb [63], а также деацетилированию ядерного субстрата H3K56 [64].

Кластер V включает несколько значимых субстратов SIRT3 с интересными молекулярными функциями, которые локализованы в нуклеоплазме: в частности, LMNA, LMNB и HIF-1 α , p53 и PRKDC, на которых остановимся далее. LMNA как субстрат SIRT3 был выявлен при помощи метода SILAC в клетках U2OS, сверхэкспрессирующих SIRT3 в отличие от нокаутных клеток, в то время как LMNB был обнаружен идентичной методикой в SIRT3 КО МЕГ при сравнении с клетками wt (табл. S1 в Приложении) [32]. Интересно, что, подобно связанным
со старением функциям SIRT3, мутации его субстрата LMNA вызывают синдром преждевременного старения, синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда [71]. Интересно, что ацетилирование K134 LMNB1 опосредует стабильность ядра и клеточного цикла. Оно индуцирует стойкую активацию контрольной точки повреждения ДНК в фазе G1/S, остановку клеточного цикла в фазе G1, отрицательно регулирует аномальное каноническое негомологичное соединение концов (cNHEJ) и вызывает активацию связывания LMNB1 с периферическими белками ядра [72]. Клетки с делетированным LMNA/С также демонстрируют аберрации в репарации удаленных оснований ДНК (BER) [73], репарации двунитевого разрыва ДНК (DSB) и гомологичной рекомбинации (HR) [71]. В связи с широким спектром интересных функций ламинов и практически отсутствием информации об их деацетилировании соответствующие исследования SIRT3 заслуживают внимания.

Еще одним важным субстратом, включенным в этот кластер, является HIF-1 α (табл. S1 в Приложении) [32], который также деацетилируется SIRT1 в позиции K674 [74]. SIRT3 является важнейшим регулятором метаболизма раковых клеток, поскольку он опосредует переход метаболизма на гликолиз путем дестабилизации HIF-1 α посредством его деацетилирования. Нокаут приводит к росту уровня ROS, стабилизирует HIF-1 α и усиливает эффект Варбурга, в то время как сверхэкспрессия действует как супрессор опухоли путем ингибирования гликолиза и пролиферации раковых клеток [13, 75].

Другим важным субстратом, входящим в этот кластер, является p53, классический супрессор опухолей, который уже был идентифицирован как субстрат SIRT3 в раковых клетках с дефицитом PTEN [76]. Удивительно, но весь биологический процесс нейродегенерации может быть обращен вспять лишь за счет увеличения экспрессии SIRT3, поскольку при коэкспрессии с p53 сиртуин 3 предотвращает повреждение митохондрий нейронов [77]. Активация SIRT3 может приводить к эффективному снижению уровня повреждений при нейродегенерации, вызванной повышением p53, что является перспективным в контексте разработки терапии.

Еще один важный субстрат, ДНК-зависимая протеинкиназа (PRKDC, DNA-PK) [30, 32] является ядерным ферментом, участвующим в соединении концов при репарации двунитевого разрыва ДНК (NHEJ) [78, 79]. DNA-PK также участвует в сохранении длины теломер и их защите, что имеет большое значение как при раке, так и при старении. В процессе старения, когда накапливаются разрывы ДНК, активация

DNA-PK приводит к снижению биоэнергетики митохондрий и физической формы мышц [80, 81]. Схожим с SIRT3 является эффект диеты с ограничением калорий (CR, calorie restriction) и аэробных упражнений, которые могут снижать активность пируваткиназы в процессе старения [80]. С другой стороны, SIRT3 стимулируется питательными веществами, ограничением калорий и физическими упражнениями, что приводит к функциональной активации митохондрий и антивозрастным эффектам [4]. Функциональные последствия деацетилирования SIRT3 DNA-PK в производстве энергии митохондриями и механизмах репарации ДНК неизвестны, хотя и могут быть частично предсказаны по основным функциям. Это могло бы стать интересным предметом для дальнейших научных исследований.

Деацетилирование PARK7 также может быть потенциально интересным для дальнейшего экспериментального изучения. Мутации в гене PARK7 являются причиной БП с ранним началом [82], заболеванием, тесно ассоциированным с сетью взаимодействий SIRT3 с субстратами (рис. 1, *a*).

Кластер VI характеризуется молекулярными функциями, ассоциированными с инактивацией ROS и β-окислением жирных кислот, а также уникальной пероксисомной локализацией, требующей экспериментальной проверки. Субстраты могут сначала быть обработаны в митохондриях и ядрах, а затем перемещаться в пероксисомы. Это наблюдение подтверждается существованием участков мембранного контакта пероксисом с другими органеллами, включая митохондрии и ядра [83].

Наконец, отобранные субстраты SIRT3 были отсортированы по отдельным кластерам на основе их субклеточной локализации в митохондриальных, ядерных и пероксисомных компартментах. Помимо группы исключительно ядерных субстратов, гистонов, другие кодируемые в ядре белки с важными митохондриальными функциями деацетилируются SIRT3. Настоящая работа подтверждает экспериментальные наблюдения о том, что SIRT3 взаимодействует также с субстратами в ядре, а не исключительно в митохондриях. Несколько новых ядерных субстратов SIRT3 с потенциально интересными биологическими функциями, включая LMNA, LMNB, HIF-1α, DNA-PK и PARK7, отобраны для дальнейших экспериментальных исследований. Слияние пероксисомной мембраны с другими органеллами может быть возможным объяснением появления субстратов SIRT3 в пероксисомах, однако для подтверждения потребуется дальнейшее экспериментальное исследование.

Регуляция ВАСЕ1. Что касается молекулярной функции при БА (табл. 1), активация ферментативной активности SIRT3 значительно ингибирует выработку Аβ в головном мозге посредством ингибирования β-секретазы (BACE1) [84], фермента первой и скорость-лимитирующей стадии воздействия на предшественник бета-амилоида (APP). Путь, способствующий регуляторному воздействию SIRT3 на активность BACE1, был построен с использованием базы знаний WikiPathways с приложением GeneMania и дополнительным анализом литературы. Была создана рабочая модель механизма ингибирования выработки Аβ в головном мозге (рис. 3).

В качестве первого шага SIRT3, активированный физическими упражнениям и/или ограничением калорий, деацетилирует и активирует серин/треонин-протеинкиназу 11 (LKB1, STK11; табл. S2 в Приложении), за которым следует фосфорилирование AMPK и активация пути SIRT3-LKB1-AMPK [18]. Это приводит к активации PGC-1α [84], репрессора BACE1, который подавляет выработку Аβ в головном моз-



Рис. 3. Рабочая гипотеза механизма ингибирования синтеза Аβ в головном мозге. Показана регуляция β-секретазы (BACE1, BACE) на основе сконструированного пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1. Изображение пути было создано при использовании базы знаний приложения WikiPathways в среде Cytoscape (3.7.2) и данных литературы [18, 84–87]

298

ДЕАЦЕТИЛИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ SIRT3

Консолидированный путь	Ранг	Описание базы данных
Циркадные часы (СС)	10,55	Reactome React 24941.3
Болезнь Хантингтона	9,07	KEGG hsa05016
Сигнальные события, опосредованные HDAC класса I	7,85	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
Биология развития	7,83	Reactome React 111045.1
Метаболизм жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел	5,02	Reactome React 22279.2
LKB1-регулирование	3,98	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
р38-α и р38-β регулирование	3,57	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
Сеть факторов транскрипции ATF-2	2,57	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
Регуляция активности АМРК с помощью LKB1	1,91	Reactome React 21285.1
FSH	1,90	Netpath
Сигнальные события, опосредованные HDAC класса III	1,85	Взаимодействие путей Database NCI-Nature Curated Data
mTOR сигнальный путь	1,77	KEGG hsa04150
Сигнальный путь адипоцитокина	1,75	KEGG hsa04920
BDNF	0,96	IOB
РІЗК-каскад	0,69	Reactome React 976.2
АМРК ингибирует активацию транскрипции посредством chREBP	0,15	Reactome React 1988.3

Таблица 2. Анализ обогащения пути с помощью приложения GeneMania в среде Cytoscape (3.7.2); все белки пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 использовались в качестве запроса

Примечание. Анализ проводился с использованием базы данных *H. sapiens* (обновление 13-07-2017) и включал все типы взаимодействий. Путь циркадных часов получил в анализе самый высокий ранг.

* Ранг (вес) показывает прогностическую ценность, присвоенную GeneMania в отношении того, насколько указанные пути соответствуют набору данных, указанных в запросе, по сравнению другими данными (вне запроса).

ге [85] (рис. 3). Альтернативно, SIRT3 также активирует CREB, который непосредственно стимулирует промотор PGC-1α [86]. PGC-1α дополнительно требует присутствия PPARG для регулирования экспрессии BACE1. В соответствии с этой моделью уровень экспрессии PGC-1α снижается в гиппокампе пациентов с БА по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста [87], что подтверждает актуальность гипотетического пути SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (рис. 3).

Молекулярные функции пути SIRT3-LKB1-АМРК-СREВ-PGC1А-PPARG-BACE1 (рис. 3) [18, 84–87] были исследованы с помощью анализа обогащения пути, выполненного с использованием приложения GeneMania. Интересно, что наивысший ранг (вес) получили циркадные часы (circadian clock, CC) (табл. 2). Это может быть связано с функцией PGC-1а, который оказывает ингибирующее действие на активность BACE1. PGC-1а также является ключевым регулятором колебаний в циркадном цикле BMAL1 и CLOCK, координирует функции молекулярных часов и энергетического метаболизма у млекопитающих [87].

Интересно, что регулятор циркадного ритма мелатонин также активирует PGC-1 α , который далее взаимодействует с эстроген-зависимым рецептором α (ERRA), непосредственно связанным с промотором SIRT3, и усиливает его транскрипционную активность [88]. Более того, СС регулируют ритм NAD⁺-зависимого SIRT3 через путь никотинамидрибозида (NR), который активируется доступностью питательных веществ в период кормления [89]. Нарушение СС может быть причиной заболеваний, связанных с системой взаимодействия субстратов SIRT3 (рис. 1, *a*) при БА, БП и БХ [90].

Интересно, что ацетилирование клеточных белков также демонстрирует суточные закономерности, при этом большинство ядерных и циацетилируются топлазматических белков ночью, а митохондриальные белки модифицируются в течение дня. Ритмическое ацетилирование функционально связано с ритмическим деацетилированием, в то время как SIRT3 является основной митохондриальной деацетилазой белка [89]. Следовательно, SIRT3 может функционировать как ритмическая циркадная деацетилаза ядерных и митохондриальных белков с потенциальным влиянием на развитие нейродегенеративных заболеваний, которые могут быть ассоциированы с узлами пути SIRT3-BACE1.

Регулирование СС также происходит через путь SIRT3-FOXO3-CLOCK (рис. 3), где FOXO3 является основным регулятором. В условиях низкого уровня инсулина, характерного для стареющего мозга [91], он связывается непосредственно с промотором гена *CLOCK* и регулирует его транскрипцию [92]. Активация SIRT3 увеличивает экспрессию FOXO3 за счет их прямого физического взаимодействия, которое, однако, не зависит от активности деацетилазы SIRT3 [93, 94].

В заключение следует отметить, что функция SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 тесно связана с путем CC, который нарушается при БА, БП и БХ и, по-видимому, является одной из причин развития этих заболеваний. Путь SIRT3-FOXO3-CLOCK, связанный с нарушением обмена веществ, продукцией ROS и аутофагией, также имеет отношение к патогенезу БА. Для узловых белков этих путей характерно взаимное регулирование, что является перспективным для разработки многоцелевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящий анализ сети взаимодействия субстратов основной митохондриальной деацетилазы, SIRT3, позволил выделить БА, БП, БХ и НАЖБП как заболевания, наиболее тесно ассоциированные с деацетилирующей активностью указанного фермента. Молекулярные функции, связанные с субстратами SIRT3, включают работу дыхательной цепи переноса электронов, цикл трикарбоновых кислот, метаболизм жирных кислот, триацилглицеридов и кетоновых тел. Деацетилирование SIRT3 в основном проходит в ткани бурого жира, где оно способствует адаптивному термогенезу, что также было продемонстрировано в ходе настоящего анализа.

SIRT3 деацетилирует множество субъединиц комплекса I, II и даже комплекса V MRC, при

этом деацетилирование комплекса I является основным регуляторным звеном во всей сети взаимодействия анализируемых субстратов. Анализ подтверждает существование регуляторной петли обратной связи, управляемой NADH/NAD⁺, включающей SIRT3, комплекс I MRC и ацетил-КоА-синтетазу. SIRT3 также деацетилирует и активирует ключевые ферменты цикла ТКК, такие как PDHA1, ответственную за переход от OXPHOS к гликолизу. Подавление экспрессии SIRT3 при старении приводит к снижению выработки энергии и в конечном итоге – к снижению уровня энергии в клетке. И, наконец, деацетилирование субъединиц комплексов II и V способствует регуляции продукции АТР митохондриями. По-видимому, другие факторы также играют роль в такой регуляции, поскольку нокаут SIRT3 не приводит к тотальному нарушению митохондриальной биоэнергетики, что также было бы интересно исследовать в дальнейшем.

Интересно, что в настоящей работе было выявлено несколько недостаточно изученных ядерных субстратов, которые играют роль в поддержании структуры ядра и целостности генома, стабильности клеточного цикла и репарации ДНК. Деацетилирование LMNA и LMNB (синдром Хатчинсона–Гилфорда); HIF-1α (эффект Варбурга), p53 (нейропротекция), DNA-PK (NHEJ) и PARK7 (семейная форма БП) вместе с другими субстратами, задействованными в митохондриальной биоэнергетике, возможно, способствуют антивозрастной активности SIRT3.

В тканях головного мозга SIRT3 действует как репрессор ВАСЕ1, фермента, который катализирует решающий этап производства Аβ, одного из маркеров БА. Сконструированный регуляторный путь SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 создает модель ингибирующего воздействия SIRT3 на ферментативную активность ВАСЕ1 и предлагает ряд альтернативных узлов для мультитаргетного применения фармацевтических препаратов. Этот путь тесно связан с функцией СС, которая также ухудшается при развитии БА и является прямой причиной патологических нейродегенеративных изменений. Ряд дополнительных функций, ассоциированных с БА и СС, также осуществляются при участии пути SIRT3-FOXO3-CLOCK.

SIRT3 обладает несколькими механизмами протективного действия в головном мозге и печени, включая предотвращение повреждений митохондрий как последствий нарушения в дыхательной цепи переноса электронов, подавление ROS, ингибирование снижения мембранного потенциала митохондрий и регуляцию мито-

фагии. Повышение экспрессии и активности SIRT3 в головном мозге и печени представляется особенно полезным для уравновешивания негативных последствий старения. Контроль функций комплекса I и II MRC в печени также полезен для лечения НАЖБП.

Фармакологическая активация SIRT3 в сочетании со стимулирующим эффектом регулярных физических упражнений видится привлекательным вариантом для снижения негативных последствий старения. Активации продукции энергии митохондриями на основе регуляции приоритетных узлов в сети взаимодействия SIRT3 с субстратами также является потенциальной стратегией борьбы с возрастными изменениями.

Thong H I Punkonhorg I rogu

- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., et al. (2007) Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation, *Mol. Cell. Biol.*, 27, 8807-8814, doi: 10.1128/mcb.01636-07.
- McDonnell, É., Peterson, B. S., Bomze, H. M., and Hirschey, M. D. (2015) SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging, *Trends Endocrinol. Metab.*, 26, 486-492, doi: 10.1016/j.tem.2015.06.001.
- Zhu, Y., Yan, Y., Principe, D. R., Zou, X., Vassilopoulos, A., et al. (2014) SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis, *Cancer Metab.*, 2, 15, doi: 10.1186/2049-3002-2-15.
 Vassilopoulos, A., Pennington, J. D., Andresson, T., Rees,
- Vassilopoulos, A., Pennington, J. D., Andresson, T., Rees, D. M., Bosley, A. D., et al. (2013) SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress, *Antioxid. Redox Signal.*, 21, 551-564, doi: 10.1089/ars.2013.5420.
- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., et al. (2013) SIRT3 reverses aging-associated degeneration, *Cell Rep.*, **3**, 319-327, doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.005.
- Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., et al. (2015) Differential expression of sirtuins in the aging rat brain, *Front Cell Neurosci.*, 9, 167, doi: 10.3389/fncel.2015.00167.
- Weir, H. J. M., Murray, T. K., Kehoe, P. G., Love, S., Verdin, E. M., et al. (2012) CNS SIRT3 expression is altered by reactive oxygen species and in Alzheimer's disease, *PLoS One*, 7, 3-9, doi: 10.1371/journal.pone. 0048225.
- Oti, M. (2006) Predicting disease genes using protein-protein interactions, J. Med. Genet., 43, 691-698, doi: 10.1136/jmg.2006.041376.
- Poulose, N., and Raju, R. (2015) Sirtuin regulation in aging and injury, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 2442-2455, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.08.017.
- Hallows, W. C., Lee S., and Denu, J. M. (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10230-10235, doi: 10.1073/pnas.0604392103.
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K. E., Schwer, B., et al. (2010) SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production, *Cell Metab.*, **12**, 654-661, doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.003.
- 12. Bharathi, S. S., Zhang, Y., Mohsen, A. W., Uppala, R., Balasubramani, M., et al. (2013) Sirtuin 3 (SIRT3) protein

БИОХИМИЯ том 87 вып. 2 2022

Благодарности. Исследование было выполнено при поддержке Biochemworld со., округ Уппсала, Швеция.

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 (www.springer.com/journal/ 10541), том 87, вып. 1, 2022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

regulates long-chain acyl-CoA dehydrogenase by deacetylating conserved lysines near the active site, *J. Biol. Chem.*, **288**, 33837-33847, doi: 10.1074/jbc.M113.510354.

- Finley, L. W. S. S., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., et al. (2011) SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1α destabilization, *Cancer Cell*, **19**, 416-428, doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.014.
- Sundaresan, N. R., Samant, S. A., Pillai, V. B., Rajamohan, S. B., and Gupta, M. P. (2008) SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70, *Mol. Cell. Biol.*, 28, 6384-6401, doi: 10.1128/ mcb.00426-08.
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E., and Chen, D. (2010) Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation, *Cell Metab.*, **12**, 662-667, doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.015.
- Yu, W., Dittenhafer-Reed, K. E., and Denu, J. M. (2012) SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status, *J. Biol. Chem.*, 287, 14078-14086, doi: 10.1074/jbc.M112.355206.
- Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C. F. W., et al. (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5, *J. Mol. Biol.*, 382, 790-801, doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.048.
- Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Gupta, M. M. P., Rajamohan, S. B., et al. (2010) Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway, *J. Biol. Chem.*, 285, 3133-3144, doi: 10.1074/jbc.M109.077271.
- Yang, Y., Cimen, H., Han, M. J., Shi, T., Deng, J. H., et al. (2010) NAD⁺-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10, *J. Biol. Chem.*, 285, 7417-7429, doi: 10.1074/jbc.M109.053421.
 Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E.,
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., et al. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation, *Nature*, 464, 121-125, doi: 10.1038/nature08778.
- Xue, L., Xu, F., Meng, L., Wei, S., Wang, J., et al. (2012) Acetylation-dependent regulation of mitochondrial ALDH2 activation by SIRT3 mediates acute ethanolinduced eNOS activation, *FEBS Lett.*, 586, 137-142, doi: 10.1016/j.febslet.2011.11.031.
- Wang, Z., Inuzuka, H., Zhong, J., Liu, P., Sarkar, F. H., et al. (2012) Identification of acetylation-dependent regulatory

mechanisms that govern the oncogenic functions of Skp2, *Oncotarget*, **3**, 1294-1300, doi: 10.18632/oncotarget.740.

- Tseng, A. H. H., Shieh, S. S., and Wang, D. L. (2013) SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.*, 63, 222-234, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.002.
- Jing, E., O'Neill, B. T., Rardin, M. J., Kleinridders, A., Ilkeyeva, O. R., et al. (2013) Sirt3 regulates metabolic flexibility of skeletal muscle through reversible enzymatic deacetylation, *Diabetes*, 62, 3404-3417, doi: 10.2337/ db12-1650.
- Cheng, Y., Ren, X., Gowda, A. S. P., Shan, Y., Zhang, L., et al. (2013) Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress, *Cell Death Dis.*, 4, 1-11, doi: 10.1038/cddis.2013.254.
- Samant, S. A., Zhang, H. J., Hong, Z., Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., et al. (2014) SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 807-819, doi: 10.1128/mcb. 01483-13.
- Lu, Z., Chen, Y., Aponte, A. M., Battaglia, V., Gucek, M., et al. (2015) Prolonged fasting identifies heat shock protein 10 as a sirtuin 3 substrate: Elucidating a new mechanism linking mitochondrial protein acetylation to fatty acid oxidation enzyme folding and function, *J. Biol. Chem.*, 290, 2466-2476, doi: 10.1074/jbc.M114.606228.
- Rauh, D., Fischer, F., Gertz, M., Lakshminarasimhan, M., Bergbrede, T., et al. (2013) An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms, *Nat. Commun.*, 4, 2327-2337, doi: 10.1038/ncomms3327.
- Yang, H., Zhou, L., Shi, Q., Zhao, Y., Lin, H., et al. (2015) SIRT 3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth, *EMBO J.*, 34, 1110-1125, doi: 10.15252/ embj.201591041.
- Rardin, M. J., Newman, J. C., Held, J. M., Cusack, M. P., Sorensen, D. J., et al. (2013) Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 6601-6606, doi: 10.1073/pnas. 1302961110.
- Hebert, A. S., Dittenhafer-Reed, K. E., Yu, W., Bailey, D. J., Selen, E. S., et al. (2013) Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome, *Mol. Cell.*, 49, 186-199, doi: 10.1016/ j.molcel.2012.10.024.
- Sol, E. M., Wagner, S. A., Weinert, B. T., Kumar, A., Kim, H. S., et al. (2012) Proteomic investigations of lysine acetylation identify diverse substrates of mitochondrial deacetylase Sirt3, *PLoS One*, 7, 1-9, doi: 10.1371/journal.pone. 0050545.
- Consortium, T. U. (2021) UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Res.*, 49, D480-D489, doi: 10.1093/nar/gkaa1100.
- Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Scott A. F., and Hamosh, A. (2019) OMIM. org: Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships, *Nucleic Acids Res.*, 47, D1038-D1043, doi: 10.1093/nar/gky1151.
- Zuberi, K., Franz, M., Rodriguez, H., Montojo, J., Lopes, C. T., et al. (2013) GeneMANIA prediction server 2013 update, *Nucleic Acids Res.*, 41, 115-122, doi: 10.1093/ nar/gkt533.
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., et al. (2010) The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function, *Nucleic Acids Res.*, 38, 214-220, doi: 10.1093/nar/gkq537.

- Franz, M., Rodriguez, H., Lopes, C., Zuberi, K., Montojo, J., et al. (2018) GeneMANIA update 2018, *Nucleic Acids Res.*, 46, W60-W64, doi: 10.1093/nar/ gky311.
- Lopes, C. T., Franz, M., Kazi, F., Donaldson, S. L., Morris, Q., et al. (2010) Cytoscape Web: An interactive web-based network browser, *Bioinformatics*, 26, 2347-2348, doi: 10.1093/bioinformatics/btq430.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., et al. (2019) STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Res.*, 47, D607-D613, doi: 10.1093/ nar/gky1131.
- Enright, A. J., Van Dongen, S., and Ouzounis, C. A. (2002) An efficient algorithm for large-scale detection of protein families, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1575-1584, doi: 10.1093/nar/30.7.1575.
- Chin, C.-H. H., Chen, S.-H. H., Wu, H.-H. H., Ho, C.-W. W., Ko, M.-T. T., et al. (2014) CytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome, *BMC Syst. Biol.*, 8, 1-7, doi: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
- 42. Bader, G. D., and Hogue, C. W. V. (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks, *BMC Bioinformatics*, **4**, 1-27, doi: 10.1186/1471-2105-4-2.
- Kutmon, M., Lotia, S., Evelo, C. T., and Pico, A. R. (2014) WikiPathways App for Cytoscape: Making biological pathways amenable to network analysis and visualization, *F1000Res.*, **3**, 152, doi: 10.12688/f1000research. 4254.2.
- 44. Liu, L., Peritore, C., Ginsberg, J., Kayhan, M., and Donmez, G. (2015) SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity, *Neurochem. Res.*, **40**, 600-608, doi: 10.1007/s11064-014-1507-8.
- 45. Bader, J. S., Chaudhuri, A., Rothberg, J. M., and Chant, J. (2004) Gaining confidence in high-throughput protein interaction networks, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 78-85, doi: 10.1038/nbt924.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., et al. (2013) STRING v9.1: Protein–protein interaction networks, with increased coverage and integration, *Nucleic Acids Res.*, 41, 808-815, doi: 10.1093/ nar/gks1094.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., et al. (2017) The STRING database in 2017: Quality-controlled protein—protein association networks, made broadly accessible, *Nucleic Acids Res.*, 45, D362-D368, doi: 10.1093/nar/gkw937.
- 48. Van Dongen, S. M. (2000) *Graph Clustering by Flow Simulation*, Utrecht University Repository. Dissertation [English]. Utrecht University, Utrecht.
- Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., In, H. L., Liu, J., et al. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14447-14452, doi: 10.1073/pnas.0803790105.
- Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., and Yamamoto, T. T. (2001) Acetyl-CoA Synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate, *J. Biol. Chem.*, 276, 11420-11426, doi: 10.1074/ jbc.M008782200
- Bao, J., Scott, I., Lu, Z., Pang, L., Dimond, C. C., et al. (2010) SIRT3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity, *Free Radic. Biol. Med.*, 49, 1230-1237, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010. 07.009.
- 52. Finley, L. W. S., Haas, W., Desquiret-Dumas, V., Wallace, D. C., Procaccio, V., et al. (2011) Succinate dehydroge-

nase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity, *PLoS* One, **6**, 4-9, doi: 10.1371/journal.pone.0023295.

- Cimen, H., Han, M.-J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., et al. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria, *Biochemistry*, 49, 304-311, doi: 10.1021/bi901627u.
- 54. Yang, W., Nagasawa, K., Münch, C., Xu, Y., Satterstrom, K., et al. (2016) Mitochondrial sirtuin network reveals dynamic SIRT3-dependent deacetylation in response to membrane depolarization, *Cell*, **167**, 985-1000, e21, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.016.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P., and Gibson, G. E. (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications, *Ann. Neurol.*, 57, 695-703, doi: 10.1002/ana.20474.
- Ozden, O., Park, S.-H., Wagner, B. A., Song, H. Y., Zhu, Y., et al. (2014) SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **76**, 163-172, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001.
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., and Shirlaw, J. T. (1927) The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.*, 8, 519-530, doi: 10.1085/jgp.8.6.519.
- 58. Stacpoole, P. W. (2012) The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases, *Aging Cell*, **11**, 371-377, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00805.x.
- Zhou, Q., Lam, P. Y., Han, D., and Cadenas, E. (2009) Activation of c-Jun-N-terminal kinase and decline of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity during brain aging, *FEBS Lett.*, **583**, 1132-1140, doi: 10.1016/ j.febslet.2009.02.043.
- 60. Scher, M. B., Vaquero, A., and Reinberg, D. (2007) SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress, *Genes Dev.*, **21**, 920-928, doi: 10.1101/gad.1527307.
- 61. Cooper, H. M., and Spelbrink, J. N. (2008) The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial, *Biochem. J.*, **411**, 279-285, doi: 10.1042/BJ20071624.
- Gurd, B. J., Holloway, G. P., Yoshida, Y., and Bonen, A. (2012) In mammalian muscle, SIRT3 is present in mito-chondria and not in the nucleus; and SIRT3 is upregulated by chronic muscle contraction in an adenosine monophos-phate-activated protein kinase-independent manner, *Metabolism*, **61**, 733-741, doi: 10.1016/j.metabol.2011.09. 016.
- Vedrenne, V., Gowher, A., De Lonlay, P., Nitschke, P., Serre, V., et al. (2012) Mutation in PNPT1, which encodes a Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase, impairs RNA import into mitochondria and causes respiratory-chain deficiency, *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 912-918, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.09.001.
- Palmieri, L., Pardo, B., Lasorsa, F. M., del Arco, A., Kobayashi, K., et al. (2001) Citrin and aralar1 are Ca²⁺stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria, *EMBO J.*, **20**, 5060-5069, doi: 10.1093/emboj/ 20.18.5060.
- 65. Galmiche, L., Serre, V., Beinat, M., Zossou, R., Assouline, Z., et al. (2012) Toward genotype phenotype correlations in GFM1 mutations, *Mitochondrion*, **12**, 242-247.
- 66. Fukumura, S., Ohba, C., Watanabe, T., Minagawa, K., Shimura, M., et al. (2015) Compound heterozygous GFM2 mutations with Leigh syndrome complicated by arthrogryposis multiplex congenita, *J. Hum. Genet.*, **60**, 509-513, doi: 10.1038/jhg.2015.57.
- 67. Perli, E., Pisano, A., Glasgow, R. I. C., Carbo, M., Hardy, S. A., et al. (2019) Novel compound mutations in the mitochondrial translation elongation factor (TSFM) gene cause severe cardiomyopathy with myocardial fibro-adipose

replacement, *Sci. Rep.*, **9**, 1-13, doi: 10.1038/s41598-019-41483-9.

- Shi, H., Hayes, M., Kirana, C., Miller, R., Keating, J., et al. (2012) TUFM is a potential new prognostic indicator for colorectal carcinoma, *Pathology*, 44, 506-512, doi: 10.1097/PAT.0b013e3283559cbe.
- Sengupta, A., and Haldar, D. (2018) Human sirtuin 3 (SIRT3) deacetylates histone H3 lysine 56 to promote nonhomologous end-joining repair, *DNA Repair (Amst)*. 61, 1-16, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.11.003.
- Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D., and Inagaki, N. (2008) Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: Shift of SIRT3 to the nucleus by co-expression with SIRT5, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 174-179, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.122.
- Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vanderwaal, R. P., Feng, Z., Biehl, K. J., et al. (2011) A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair, *Cell Cycle*, 10, 2549-2560, doi: 10.4161/cc.10.15.16531.
- Murray-Nerger, L. A., Justice, J. L., Rekapalli, P., Hutton, J. E., and Cristea, I. M. M. (2021) Lamin B1 acetylation slows the G1 to S cell cycle transition through inhibition of DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, 49, 2044-2064, doi: 10.1093/nar/gkab019.
- Maynard, S., Keijzers, G., Akbari, M., Ezra, M. B., Hall, A., et al. (2019) Lamin A/C promotes DNA base excision repair, *Nucleic Acids Res.*, 47, 11709-11728, doi: 10.1093/nar/gkz912.
- Laemmle, A., Lechleiter, A., Roh, V., Schwarz, C., Portmann, S., et al. (2012) Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1α protein under hypoxic conditions, *PLoS One*, 7, e33433, doi: 10.1371/journal.pone.0033433.
- Joo, H.-Y., Yun, M., Jeong, J., Park, E.-R., Shin, H.-J., et al. (2015) SIRT1 deacetylates and stabilizes hypoxiainducible factor-1α (HIF-1α) via direct interactions during hypoxia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **462**, 294-300, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.119.
- Xiong, Y., Wang, L., Wang, S., Wang, M., Zhao, J., et al. (2018) SIRT3 deacetylates and promotes degradation of P53 in PTEN-defective non-small cell lung cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **144**, 189-198, doi: 10.1007/ s00432-017-2537-9.
- Lee, J., Kim, Y., Liu, T., Hwang, Y. J., Hyeon, S. J., et al. (2018) SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Aging Cell*, **17**, 1-12, doi: 10.1111/acel.12679.
- Polischouk, A. G., Cedervall, B., Ljungquist, S., Flygare, J., Hellgren, D., et al. (1999) DNA double-strand break repair, DNA-PK, and DNA ligases in two human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivity, *Int. J. Radiat. Oncol.*, 43, 191-198, doi: 10.1016/S0360-3016(98)00362-9.
- Chaplin, A. K., Hardwick, S. W., Liang, S., Kefala Stavridi, A., Hnizda, A., et al. (2021) Dimers of DNA-PK create a stage for DNA double-strand break repair, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 28, 13-19, doi: 10.1038/s41594-020-00517-x.
- Park, S. J., Gavrilova, O., Brown, A. L., Soto, J. E., Bremner, S., et al. (2017) DNA-PK promotes the mitochondrial, metabolic, and physical decline that occurs during aging, *Cell Metab.*, 25, 1135-1146.e7, doi: 10.1016/ j.cmet.2017.04.008.
- Sui, J., Zhang, S., and Chen, B. P. C. (2020) DNA-dependent protein kinase in telomere maintenance and protection, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 25, 1-14, doi: 10.1186/s11658-020-0199-0.
- 82. Schrader, M., Kamoshita, M., and Islinger, M. (2020) Organelle interplay-peroxisome interactions in health and

disease, J. Inherit. Metab. Dis., 43, 71-89, doi: 10.1002/jimd.12083.

- Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., et al. (2009) Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle, *Aging (Albany NY)*, 1, 771-783, doi: 10.18632/ aging.100075.
- Ramesh, S., Govindarajulu, M., Lynd, T., Briggs, G., Adamek, D., et al. (2018) SIRT3 activator Honokiol attenuates β-amyloid by modulating amyloidogenic pathway, *PLoS One*, **13**, 1, doi: 10.1371/journal.pone.0190350.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E., and Tong, Q. (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13560-13567, doi: 10.1074/jbc. M414670200.
- Katsouri, L., Parr, C., Bogdanovic, N., Willem, M., and Sastre, M. (2011) PPARγ co-activator-1α (PGC-1α) reduces amyloid-β generation through a PPARγ-dependent mechanism, J. Alzheimer's Dis., 25, 151-162, doi: 10.3233/JAD-2011-101356.
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., and Lin, J. D. (2007) Transcriptional coactivator PGC-1α integrates the mammalian clock and energy metabolism, *Nature*, **447**, 477-481, doi: 10.1038/nature05767.
- Song, C., Zhao, J., Zhang, J., Mao, T., Fu, B., et al. (2017) SIRT3-dependent mitochondrial oxidative stress in sodi-

um fluoride-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin, *BioRxiv*, doi: 10.1101/107813.

- Mauvoisin, D., Atger, F., Dayon, L., Núñez Galindo, A., Wang, J., et al. (2017) Circadian and feeding rhythms orchestrate the diurnal liver acetylome, *Cell Rep.*, 20, 1729-1743, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.065.
- Kondratova, A. A., and Kondratov R. V. (2012) The circadian clock and pathology of the ageing brain, *Nat. Rev. Neurosci.*, 13, 325-335, doi: 10.1038/nrn3208.
- Tomita, T. (2017) Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Adv. Biol. Regul.*, 64, 33-38, doi: 10.1016/j.jbior.2017.01.001.
- Chaves, I., van der Horst, G. T. J., Schellevis, R., Nijman, R. M., Koerkamp, M. G., et al. (2014) Insulin-FOXO3 signaling modulates circadian rhythms via regulation of clock transcription, *Curr. Biol.*, 24, 1248-1255, doi: 10.1016/ j.cub.2014.04.018.
- 93. Tong, W., Ju, L., Qiu, M., Xie, Q., Chen, Y., et al. (2016) Liraglutide ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by enhancing mitochondrial architecture and promoting autophagy through the SIRT1/SIRT3-FOXO3a pathway, *Hepatol. Res.*, 46, 933-943, doi: 10.1111/hepr.12634.
- 94. Jacobs, K. M., Pennington, J. D., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Kim, H.-S., et al. (2008) SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression, *Int. J. Biol. Sci.*, 4, 4291-4299, doi: 10.7150/ijbs.4.291.

FOCUS ON MOLECULAR FUNCTIONS OF ANTI-AGING DEACETYLASE SIRT3

Jarmila Nahálková

Biochemistry, Molecular, and Cell Biology Unit, Biochemworld Co., 74394 Skyttorp, Uppsala County, Sweden; e-mail: jarmila.nahalkova@biochemworld.net

SIRT3 is a protein lysine deacetylase with a prominent role in the maintenance of mitochondrial integrity, which is a vulnerable target in many diseases. Intriguingly, cellular aging is reversible just by SIRT3 overexpression, which raises many questions about the role of SIRT3 in the molecular anti-aging mechanisms. Therefore, functions of SIRT3 were analyzed through the interaction network of 407 substrates collected by data mining. Results of the pathway enrichment and gene function prediction confirmed functions in the primary metabolism and mitochondrial ATP production. However, it also suggested involvement in thermogenesis, brain-related neurodegenerative diseases Alzheimer's (AD), Parkinson's, Huntington's disease (HD), and non-alcoholic fatty liver disease. The protein node prioritization analysis identified subunits of the complex I of the mitochondrial respiratory chain (MRC) as the nodes with the main regulatory effect within the entire interaction network. Additional high-ranked nodes were succinate dehydrogenase subunit B (SDHB), complex II, and ATP5F1, complex V of MRC. The analysis supports existence of the NADH/NAD⁺ driven regulatory feedback loop between SIRT3, complex I (MRC), and acetyl-CoA synthetases, and existence of the nuclear substrates of SIRT3. Unexplored functions of SIRT3 substrates such as LMNA and LMNB; HIF-1a, p53, DNA-PK, and PARK7 are highlighted for further scientific advances. SIRT3 acts as a repressor of BACE1 through the SIRT3-LKB1-AMPK-CREB-PGC1A-PPARG-BACE1 (SIRT3-BACE1), which functions are fitted the best by the Circadian Clock pathway. It forms a new working hypothesis as the therapeutical target for AD treatment. Other important pathways linked to SIRT3 activity are highlighted for therapeutical interventions.

Keywords: SIRT3, NAD⁺-dependent protein deacetylase, protein interaction network, pathway enrichment analysis, aging, respiratory electron transport chain, mitochondria, age-related disease