

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 1, 2022

Влияние метилирования ДНК на 3'→5'-экзонуклеазную активность основной апурин-апириимидиновой эндонуклеазы человека APEX1 <i>А.В. Ендуткин, Д.Д. Яценко, Д.О. Жарков</i>	3
Структурные и функциональные особенности вирусных шаперонинов (обзор) <i>Л.П. Курочкина, П.И. Семенюк, О.С. Соколова</i>	16
Мутации в субъединице Cox12 дрожжей снижают активность митохондриального комплекса IV <i>S. Das, S. Mukherjee, M. Bedi, A. Ghosh</i>	26
Происхождение генетического кода и трансляции в рамках современных концепций происхождения жизни (обзор) <i>Л.Г. Кондратьева, М.С. Дьячкова, А.В. Гальченко</i>	45
Компьютерное моделирование лиганд-рецепторных взаимодействий маннозного рецептора CD206 в сравнении с модельным лектином конканавалином А <i>И.Д. Злотников, Е.В. Кудряшова</i>	68
Лабильность защитной системы клетки Nrf2/Keap/ARE в различных моделях клеточного старения и возрастных патологиях (обзор) <i>Г.А. Шиловский</i>	86
Лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1 способствует онкогенезу плоскоклеточного рака пищевода путем активации DUSP4 <i>J. Han, S. Ye, J. Chen, K. Wang, J. Jin, Z. Zeng, S. Xue</i>	104
Исследование антиоксидантных свойств кватернизированного хитозана, модифицированного остатком галловой кислоты, с использованием пероксидазы, продуцирующей активные формы кислорода <i>Д.Б. Киселевский, А.В. Ильина, А.П. Луньков, В.П. Варламов, В.Д. Самуилов</i>	116
Насколько обоснованы предположения о запрограммированном старении в теориях Вейсмана? (обзор) <i>P. R. Winterhalter, A. Simm</i>	126

ХРОНИКА

Знаменательные и юбилейные даты истории биохимии 2022 г.	150
--	-----

CONTENTS

Vol. 87, Issue 1, 2022

DNA Methylation Affects the 3'→5' Exonuclease Activity of the Major Human Abasic Site Endonuclease, APEX1 <i>A. V. Endutkin, D. D. Yatsenko, and D. O. Zharkov</i>	3
Structural and Functional Features of Viral Chaperonins (Review) <i>L. P. Kurochkina, P. I. Semenyuk, and O. S. Sokolova</i>	16
Mutations in the Yeast Cox12 Subunit Severely Compromise the Activity of the Mitochondrial Complex IV <i>S. Das, S. Mukherjee, M. Bedi, and A. Ghosh</i>	26
The Origin of the Genetic Code and Translation within Current Concepts of the Origin of Life (Review) <i>L. G. Kondratyeva, M. S. Dyachkova, and A. V. Galchenko</i>	45
Computer Simulation of Receptor–Ligand Interactions Mannose Receptor CD206 in Comparison with the Model Lectin Concanavalin A <i>I. D. Zlotnikov and E. V. Kudryashova</i>	68
Lability of the Nrf2/Keap/ARE Cell Protective System in Different Models of Cell Aging and Age-Related Pathologies (Review) <i>G. A. Shilovsky</i>	86
Lysine-Specific Histone Demethylase 1 Promotes Oncogenesis of the Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Upregulating DUSP4 <i>J. Han, S. Ye, J. Chen, K. Wang, J. Jin, Z. Zeng, and S. Xue</i>	104
Investigation of the Antioxidant Properties of the Quaternized Chitosan Modified with a Gallic Acid Residue Using a Peroxidase that Produces Reactive Oxygen Species <i>D. B. Kiselevsky, A. V. Il'ina, A. P. Lunkov, V. P. Varlamov, and V. D. Samuilov</i>	116
How Justified Is the Assumption of Programmed Aging in Reminiscence of Weismann's Theories? (Review) <i>P. R. Winterhalter and A. Simm</i>	126

CHRONICLE

Notable and Anniversary Dates in Biochemistry for 2022	150
--	-----

УДК 577.123

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА 3'→5'-ЭКЗОНУКЛЕАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ОСНОВНОЙ АПУРИН-АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА APEX1

© 2022 А.В. Ендуткин¹, Д.Д. Яценко¹, Д.О. Жарков^{1,2*}

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

² Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28.07.2021

После доработки 23.11.2021

Принята к публикации 24.11.2021

Апурин-апиримидиновые (АП) эндонуклеазы – ключевые ферменты пути эксцизионной репарации оснований ДНК, гидролизующие фосфоэфирную связь АП-сайта, который образуется после удаления повреждённого основания. Основная АП-эндонуклеаза человека APEX1, помимо этого, проявляет 3'-фосфодиэстеразную и 3'→5'-экзонуклеазную активности. Биологические функции последней не выяснены; предполагается, что она может корректировать ошибки репаративного синтеза ДНК. При повреждении ДНК с 3'-стороны вблизи 5-метилцитозина (mC) проявление 3'→5'-экзонуклеазной активности может вызывать изменение статуса эпигенетического метилирования CpG-динуклеотидов. Остаётся открытым вопрос: вносит ли 3'→5'-экзонуклеазная активность APEX1 вклад в процесс активного эпигенетического деметилирования или, напротив, она лимитирована в метилированных CpG-динуклеотидах для сохранения эпигенетического статуса при репарации случайных повреждений ДНК. В работе впервые систематически исследована эффективность удаления ферментом APEX1 3'-концевых нуклеотидов из субстратов, представляющих собой интермедиаты репарации ДНК в CpG-динуклеотидах. Показано, что во всех интермедиатах олигонуклеотиды с некомплементарными матрице основаниями на 3'-конце представляют собой наилучшие, а с mC – наихудший субстрат для проявления 3'→5'-экзонуклеазной активности APEX1. Наличие mC в комплементарной цепи значительно снижает константу скорости реакции даже для некомплементарных 3'-концевых звеньев. Таким образом, эффективность 3'→5'-экзонуклеазной реакции, катализируемой APEX1, ограничена в метилированных CpG-динуклеотидах, что, вероятно, связано с необходимостью поддержания эпигенетического статуса при репарации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: повреждение ДНК, репарация ДНК, эпигенетическое деметилирование, АП-эндонуклеаза, 3'→5'-экзонуклеаза, APEX1, 5-метилцитозин.

DOI: 10.31857/S0320972522010018

ВВЕДЕНИЕ

Спонтанный гидролиз и реакции с активными формами кислорода входят в число основных причин повреждения ДНК в клетках человека [1, 2]. Они приводят к появлению в ДНК широкого круга повреждённых нуклеотидов, которые обладают высоким цитотоксичным и промутагенным потенциалом и исправляются

по механизму эксцизионной репарации оснований (ЭРО) [1]. Этот процесс инициируется различными ДНК-*N*-гликозилазами, которые могут либо катализировать гидролиз *N*-гликозидной связи между повреждённым основанием и остатком дезоксирибозы, либо дополнительно вносить одноцепочечный разрыв в ДНК по механизму β- или β,δ-элиминирования [1, 3]. Образующиеся при этом апурин-апиримидиновые сайты (АП-сайты) или 3'-концевые α,β-ненасыщенные альдегиды служат субстратами для АП-эндонуклеаз, которые гидролизуют их 5'-фосфодиэфирную связь [1]. Процесс ЭРО далее протекает с участием ДНК-полимераз и ДНК-лигаз, которые восстанавливают каноническую структуру ДНК. Кроме борьбы с повреждениями ДНК, ЭРО лежит в основе процесса активного эпигенетического деметилирования, которое у человека запускается направленным и

Принятые сокращения: АП – апурин-апиримидин-овый(ая); ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; APEX1 – апурин-апиримидиновая эндо/экзонуклеаза 1; dmCMP – 5-метилцитозин-2'-дезоксирибомонофосфат; F – 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранол-3; mC – 5-метилцитозин; OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1; oxoG – 8-оксогуанин; TET – белки семейства Ten–Eleven Translocation.

* Адресат для корреспонденции.

контролируемым диоксигеназами семейства TET (Ten—Eleven Translocation) окислением 5-метилцитозина (mC) с дальнейшим удалением продуктов окисления из ДНК [4, 5] (рис. 1, а).

Основная АП-эндонуклеаза человека — белок APEX1 — помимо собственно АП-эндонуклеазной и 3′→5′-фосфодиэстеразной активностей, обладает 3′→5′-экзонуклеазной активностью [6–8]. Поскольку она преимущественно удаляет нуклеотиды в составе неканонических пар, высказывалось предположение, что одна из функций этой активности состоит в коррекции ошибок ДНК-полимераз при репликативном или репаративном синтезе ДНК [6]. Однако считается, что у человека корректирующие функции при репликации выполняют 3′→5′-экзонуклеазы TREX1 и TREX2 [9], а кроме того, ДНК-полимеразы δ и ϵ сами обладают способностью корректировать ошибки [10]. Гораздо больше оснований полагать, что APEX1 может проявлять 3′→5′-экзонуклеазную активность в ходе ЭРО; продукты экзонуклеазной реакции часто наблюдают в реконструированных системах ЭРО, включающих ДНК-гликозилазы, APEX1, ДНК-полимеразу β и ДНК-лигазу [11–14]. С другой стороны, экзонуклеазная активность APEX1 ингибируется образующимся при репарации 5′-концевым остатком 2′-дезоксирибозо-5′-фосфата [15]. Поэтому возможные функции фермента APEX1 как экзонуклеазы при репарации ДНК остаются неясными.

Недавно было достаточно неожиданно обнаружено, что 8-оксогуанин (охоG), одно из самых распространённых окисленных оснований ДНК, служит ключевым элементом активации генов факторами транскрипции ER α [16],

c-Мyc [17], RAR α [18] и Hif-1 α [19]. Показано, что факторы транскрипции связываются с сайтами-мишенями и привлекают деметилазу гистонов LSD1, которая в ходе окислительного деметилирования форм гистонов H3K4me2 и H3K9me2 производит в качестве одного из продуктов H₂O₂, вызывающую окисление оснований гуанина в непосредственной близости от места своего возникновения. Получившиеся основания охоG удаляются из ДНК системой ЭРО с участием ДНК-гликозилазы OGG1 и APEX1, что каким-то образом приводит к активации транскрипции. Высказывалось предположение, что активирующим фактором служат возникающие в ходе репарации одноцепочечные разрывы ДНК, вызывающие релаксацию хроматина. Однако в других системах разрывы при репарации охоG в промоторах ингибируют инициацию транскрипции [20, 21]. Кроме того, показано, что одноцепочечные разрывы могут служить и «точкой входа» для экзонуклеаз либо геликаз и эндонуклеаз, которые гидролизуют более протяжённые участки цепи ДНК и могут вызывать деметилирование на значительных расстояниях от места разрыва (рис. 1, б) [22, 23]. Преимущество такого механизма для быстрой активации генов связано с возможностью удаления многих остатков mC за один раз. Однако до сих пор не была исследована потенциальная возможность эпигенетического деметилирования, связанная с репарацией охоG в метилированных CpG-динуклеотидах за счёт 3′→5′-экзонуклеазной активности APEX1 (рис. 1, в). С одной стороны, такой процесс мог бы служить дополнительным механизмом локального активного деметилирования при контролируемом повреждении ДНК.

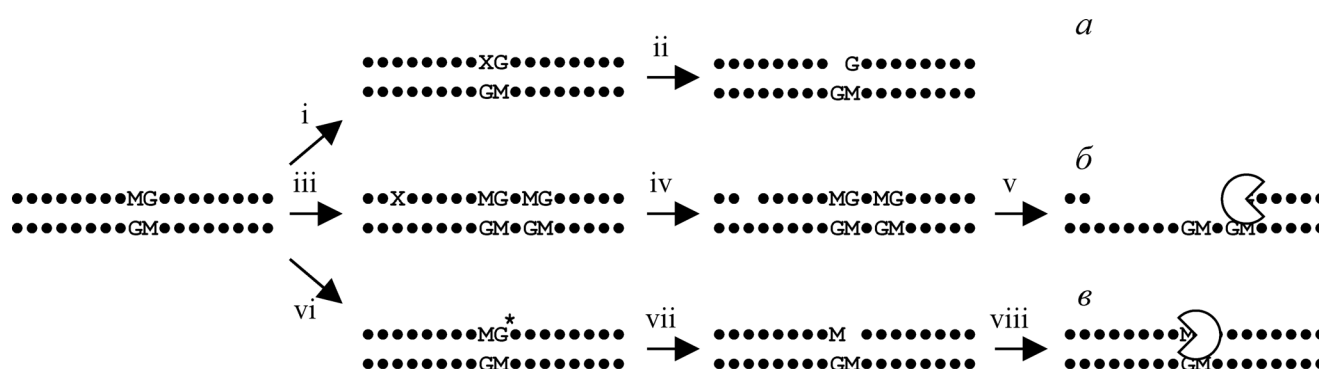


Рис. 1. Возможные пути активного деметилирования ДНК в клетках человека. Канонический путь активного деметилирования (а): направленное регулируемое повреждение 5-метилцитозина диоксигеназами TET (i) и удаление этого повреждения системой ЭРО (ii). Альтернативный путь (б): повреждение ДНК на некотором расстоянии от сайта метилирования (iii), внесение разрыва в этом месте при репарации (iv) и деградация участка ДНК экзонуклеазами (v). ОхоG-зависимый путь (в): окисление гуанина в метилированном CpG-динуклеотиде (vi), удаление охоG системой ЭРО (vii) и сопутствующий процессинг разрыва 3′→5′-экзонуклеазной активностью фермента APEX1 (viii). Условные обозначения: М — 5-метилцитозин, X — поврежденное основание, G* — 8-оксогуанин, сегментированный круг — фермент, обладающий экзонуклеазной активностью

С другой стороны, удаление mC в ходе экзонуклеазной реакции при случайном ненаправленном повреждении ДНК внутри или в непосредственной близости от CpG-сайтов изменяет статус метилирования, что даже при деметилировании единичных сайтов может иметь последствия для экспрессии генов за счёт изменения связывания регуляторных белков [24, 25] и смещения динамического равновесия между метилированием и деметилированием ДНК [26, 27].

В настоящем исследовании впервые проведён сравнительный анализ кинетики удаления ферментом АРЕХ1 канонических dNMP и 5-метилцитозин-2'-дезоксирибомонофосфата (dmCMP) с 3'-конца олигонуклеотидов в составе конструкций, моделирующих продукты ЭРО в CpG-динуклеотидах, где комплементарная цепь содержит либо не содержит mC. Показано, что dmCMP хуже всего процессируется 3'→5'-экзонуклеазной активностью АРЕХ1. Таким образом, система ЭРО, вероятно, оптимизирована для сохранения статуса метилирования при репарации случайных повреждений ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигонуклеотиды и белки. Олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН), использованные в работе, синтезировали в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН с использованием коммерчески доступных амидофосфитов («Glen Research», США). Последовательности ОДН приведены в таблице. Все ОДН подвергали очистке с помощью обращённо-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления на колонке LiChrosorb RP-18 («Merck», США), а затем с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. После обессоливания обращённо-фазовой хроматографией на сорбенте C₁₈ NenSorb ОДН при необходимости метили по 5'-концу с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы бактериофага Т4 («Биосан», Россия) и отжигали с необходимыми комплементарными цепями. Белок АРЕХ1 человека выделяли в рекомбинантном виде, как описано ранее [28].

Условия определения экзонуклеазной активности белка АРЕХ1. Реакцию проводили в объёме 60 мкл в буфере, содержащем 20 mM HEPES-NaOH (pH 6,8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитол, 4 нМ АРЕХ1 и 20 нМ ОДН-субстрат. Реакционную смесь инкубировали в течение 1–20 мин при 37 °С, отбирая аликваты (10 мкл), которые смешивали с 5 мкл раствора 20 mM ЭДТА, 0,1%-ного ксиленианола, 0,1%-ного бромфенолового синего в формами-

де и прогревали при 95 °С в течение 5 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле, содержащем 7,2 М мочевины, визуализировали при помощи радиолюминесцентного сканера Typhoon FLA 9500 Imager («GE Healthcare», США) и считывали с использованием программы Quantity One v4.6.8 («Bio-Rad Laboratories», США).

Ферментативная кинетика. Для определения параметров стационарной кинетики экзонуклеазной реакции, катализируемой ферментом АРЕХ1, реакцию проводили в объёме 10 мкл в описанном выше реакционном буфере в течение 5 мин при 37 °С. Концентрации субстрата составляли 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 нМ. Были подобраны такие концентрации фермента и время реакции, при которых расщепление субстрата не превышало 10–30%, чтобы зависимость накопления продукта от времени была близка к линейной. В большинстве случаев использовали концентрации фермента 0,5–1 нМ, что ниже минимальной концентрации субстрата, и лишь для наихудших субстратов концентрацию фермента повышали до 2–4 нМ. Реакцию останавливали и анализировали её продукты, как описано выше; для удобства обчёта на гель наносили объёмы реакционной смеси, содержащие одинаковое количество радиоактивности. Полученные экспериментальные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных 3–5 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции $v_0 = k_{\text{cat}}[E]_0[S]_0/(K_M + [S]_0)$ в программе SigmaPlot v9.0 («SPSS Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн ДНК-субстратов. Поскольку 3'→5'-экзонуклеазная активность фермента АРЕХ1 проявляется в ходе ЭРО [11–14], для её систематического исследования были сконструированы субстраты, имитирующие некоторые интермедиаты этого процесса. При этом представляло интерес сравнить экзонуклеазную активность для ДНК-субстратов, в которых комплементарная цепь содержит или не содержит mC. В связи с этим были разработаны 4 серии субстратов, каждая из которых включала две группы, различающиеся наличием C либо mC в составе CpG-динуклеотида в комплементарной цепи (таблица). Субстраты серии 1 (субстраты 1.1.1–1.1.5; 1.2.1–1.2.5) представляли собой двуцепочечные ОДН с выступающим 5'-одноцепочечным участком («праймер–матрица»), традиционно используемые для изучения активности 3'→5'-

Структуры олигонуклеотидных субстратов, использованных в работе

3'-концевой нуклеотид и статус метилирования*		Структура субстрата**, ***
Праймер–матрица (серия 1)		
X = C 1.1.1. N = C 1.1.2. N = T 1.1.3. N = A 1.1.4. N = G 1.1.5. N = M	X = M 1.2.1. N = C 1.2.2. N = T 1.2.3. N = A 1.2.4. N = G 1.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN CCATGTATAGCTCACTCTG <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC
Одноцепочечный разрыв (серия 2)		
X = C 2.1.1. N = C 2.1.2. N = T 2.1.3. N = A 2.1.4. N = G 2.1.5. N = M	X = M 2.2.1. N = C 2.2.2. N = T 2.2.3. N = A 2.2.4. N = G 2.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN GTCAAGTTGGGCTTACTCAGG CCATGTATAGCTCACTCTG~ <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC
Одноцепочечный разрыв при 5'-концевом АП-сайте (продукт АП-эндонуклеазной реакции) (серия 3)		
X = C 3.1.1. N = C 3.1.2. N = T 3.1.3. N = A 3.1.4. N = G 3.1.5. N = M	X = M 3.2.1. N = C 3.2.2. N = T 3.2.3. N = A 3.2.4. N = G 3.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN F TCAAGTTGGGCTTACTCAGG CCATGTATAGCTCACTCTG~ <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC
Однонуклеотидная брешь (серия 4)		
X = C 4.1.1. N = C 4.1.2. N = T 4.1.3. N = A 4.1.4. N = G 4.1.5. N = M	X = M 4.2.1. N = C 4.2.2. N = T 4.2.3. N = A 4.2.4. N = G 4.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN TCAAGTTGGGCTTACTCAGG CCATGTATAGCTCACTCTG <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC

Примечание. * М – 5-метилцитозин; ** F – 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранол-3.

*** Верхняя цепь записана в направлении 5'→3'.

эксонуклаз. Субстраты серии 2 (2.1.1–2.1.5; 2.2.1–2.2.5) содержали разрыв с 3'-стороны от удаляемого дезоксинуклеотида. Субстраты серии 3 (3.1.1–3.1.5; 3.2.1–3.2.5) также содержали разрыв, при этом на 5'-конце примыкающего к разрыву ОДН содержался остаток 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранола-3 (F) – аналога 2'-дезоксирибозы, не подверженного β-элиминированию, и потому гораздо более стабильного в физиологических условиях по сравнению с АП-сайтом; этот модифицированный нуклеотид часто применяется в исследованиях мутагенеза

и репарации ДНК [29, 30]. Субстраты такого строения моделируют структуру интермедиата репарации, образующегося после действия монофункциональной ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы. Остаток F не содержал 5'-концевой фосфатной группы, которая заметно снижает 3'→5'-эксонуклеазную активность АРЕХ1 [15]. Наконец, субстраты серии 4 (субстраты 4.1.1–4.1.5; 4.2.1–4.2.5) содержали однонуклеотидную брешь с 3'-стороны от удаляемого дезоксинуклеотида; они служат моделью интермедиата репарации, образующегося после β-эли-

минирования и действия АП-эндонуклеазы, либо после β, δ -элиминирования. Во всех случаях напротив удаляемого 3'-концевого звена располагалось основание G, которое с 5'-стороны в своей цепи соседствовало либо с C (субстраты 1.1.1–1.1.5; 2.1.1–2.1.5; 3.1.1–3.1.5; 4.1.1–4.1.5), либо с mC (субстраты 1.2.1–1.2.5; 2.2.1–2.2.5; 3.2.1–3.2.5; 4.2.1–4.2.5). На 3'-конце гидролизуемого ОДН содержались либо dCMP или dmCMP полностью комплементарные матрице, либо некомплементарные нуклеотиды.

3'-концевой dmCMP неэффективно удаляется 3'→5'-экзонуклеазной активностью АРЕХ1. На примере субстратов серии 1, не содержащих дополнительного примыкающего ОДН, была исследована общая эффективность удаления комплементарных и некомплементарных 3'-концевых dNMP ферментом АРЕХ1 (рис. 2). Во всех случаях для субстратов, содержащих неканонические пары, наблюдался более высокий уровень накопления продуктов реакции, что в целом согласуется с литературными данными [6–8]. Скорость реакции для субстратов группы 1.1 уменьшалась в ряду $T \sim A > G > C > mC$, аналогичная закономерность наблюдалась для группы 1.2: $T > A \sim G > C > mC$. Разные неканонические пары (A/G, G/G, T/G) незначительно отличались друг от друга по эффективности расщепления. Удаление 3'-концевого dmCMP, полностью комплементарного матрице, в использованных условиях было ещё менее эффективно, чем удаление dCMP. Предпочтительное удаление некомплементарных 3'-концевых нуклеотидов сохранялось при метилировании комплементарной цепи, однако во всех случаях наблюдалась тенденция к замедлению реакции при

наличии в комплементарной цепи остатка mC (ср. рис. 2, а и б).

3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 зависит от природы разрыва в ДНК. Для количественного анализа 3'→5'-экзонуклеазной активности фермента АРЕХ1 были определены параметры стационарной кинетики этой реакции для субстратов, различающихся окружением деградируемого 3'-конца (серии 1–4, см. выше). На рис. 3 приведены результаты типичных экспериментов по определению кинетических параметров (K_M , k_{cat}) реакции.

При рассмотрении профилей значений константы Михаэлиса (K_M), константы скорости реакции (k_{cat}) и константы специфичности ($k_{sp} = k_{cat}/K_M$) (рис. 4) выявляются некоторые закономерности их зависимости от природы субстрата. В системе типа «праймер–матрица» наибольшая константа скорости реакции наблюдалась для всех субстратов с некомплементарным 3'-концевым нуклеотидом, однако K_M для них была выше, чем для субстратов с полностью комплементарным праймером, и в результате значения k_{sp} были близки. Праймер с 3'-концевым mC в такой системе характеризовался значениями k_{cat} , близкими к таковым для полностью комплементарного праймера, при высокой K_M , таким образом, mC удалялся с 3'-конца хуже всего.

Наличие примыкающего ОДН, отделённого разрывом или одноцепочечной брешью от 3'-конца праймера, несколько изменяло субстратные предпочтения 3'→5'-экзонуклеазной активности АРЕХ1. Наивысшая константа скорости реакции в обоих случаях наблюдалась для праймера с dTMP на 3'-конце, однако при этом для

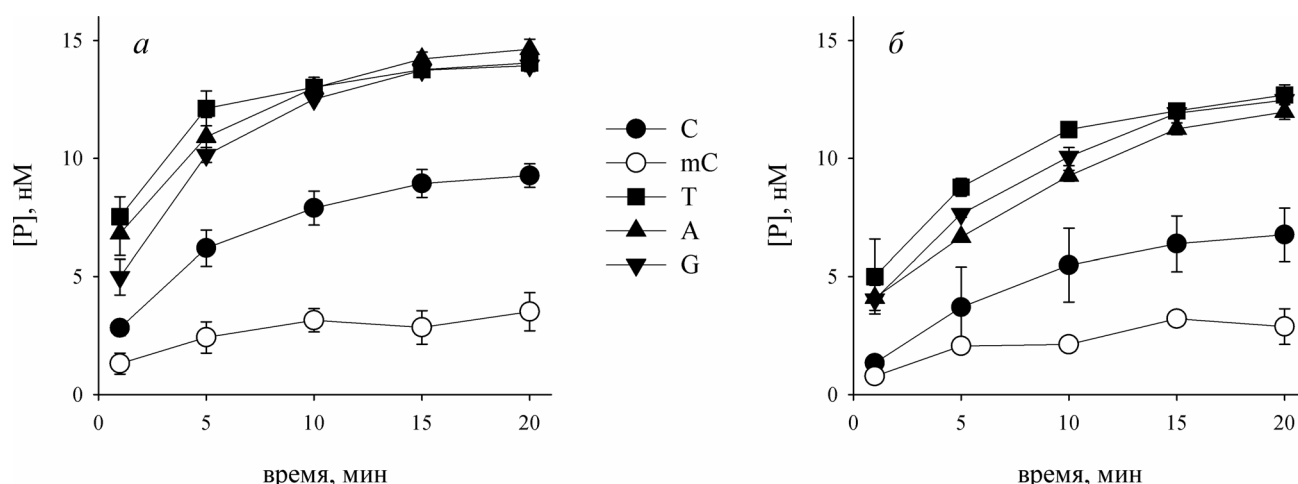


Рис. 2. Зависимость накопления продукта экзонуклеазного расщепления субстратов 1.1.1–1.1.5 (а) и 1.2.1–1.2.5 (б) ферментом АРЕХ1 от времени (фермент – 4 нМ, субстрат – 20 нМ, условия реакции описаны в разделе «Материалы и методы»). Приведены средние значения и стандартные ошибки ($n = 3$)

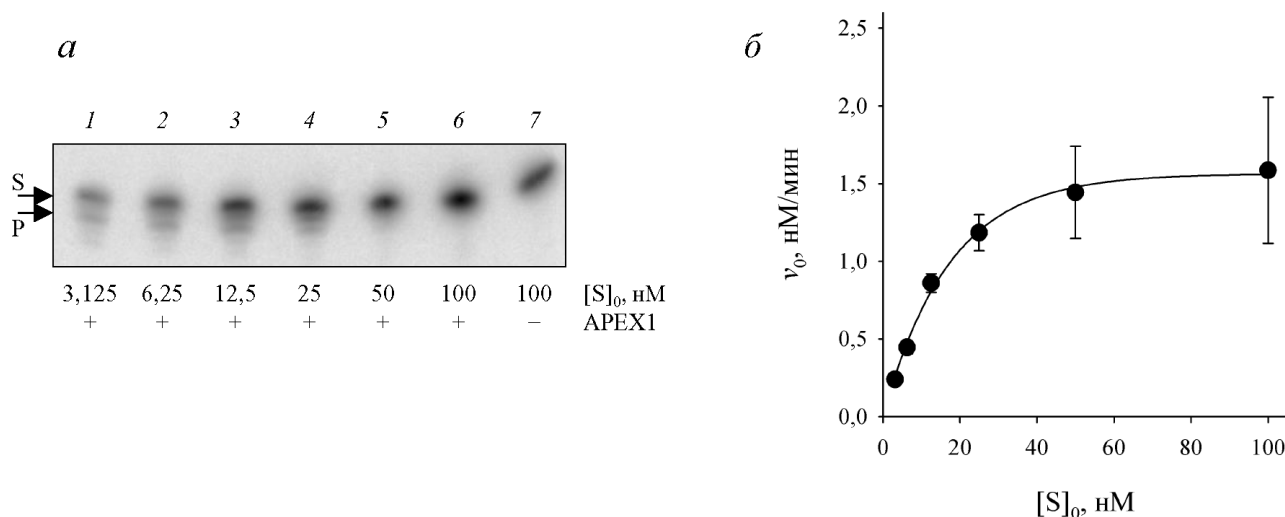


Рис. 3. Репрезентативный радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов 3'→5'-экзонуклеазной реакции (а, субстрат 2.1.3) и зависимость скорости накопления продукта от концентрации субстрата (б). Концентрации субстрата указаны на рисунке. Концентрация фермента составляла 3 нМ, время реакции – 5 мин

него повышалось и значение K_M , в результате чего константы специфичности для всех субстратов с некомплементарными 3'-концами были сходны. Значения k_{cat} для субстратов с С или mС на 3'-конце были заметно ниже, чем для субстратов с некомплементарными 3'-концами. При наличии бреши в несколько раз снижались значения K_M для субстратов с А и G на конце праймера. В целом при отсутствии метилирования специфичность АРЕХ1 по отношению к разным 3'-концевым нуклеотидам была похожа для субстратов без примыкающего ОДН, с разрывом и с брешью.

В присутствии остатка F на 5'-конце примыкающего ОДН значение K_M для субстратов с 3'-концевым С возрастало (рис. 4, а). Поскольку остаток F служит аналогом 5'-концевого остатка 2'-дезоксирibo-5'-фосфата, возникающего как интермедиат ЭРО, этот результат согласуется с литературными данными о низкой 3'→5'-экзонуклеазной активности АРЕХ1 в таких субстратах [15]. Однако примечательно, что для 3'-концевого mС эффективность экзонуклеазной реакции АРЕХ1 не изменялась, вследствие чего С и mС удалялись с близкой константой специфичности (рис. 4, д).

3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 снижена при метилировании комплементарной цепи. Наличие остатка mС в комплементарной цепи ДНК-субстрата оказывало неожиданно большое влияние на 3'→5'-экзонуклеазную активность АРЕХ1. При сравнении действия фермента АРЕХ1 по отношению к субстратам групп 1.1–4.1 и 1.2–4.2 заметно снижались (в 4–23 раза) значения k_{cat} для всех типов субстратов с не-

комплементарным 3'-концевым нуклеотидом (субстраты 2, 3 и 4 в каждой группе), если комплементарная цепь была метилирована, в то время как последствия модификации субстратов с комплементарным 3'-концевым нуклеотидом (С и mС; субстраты 1 и 5 в каждой группе) были гораздо ниже или вовсе не наблюдались (рис. 4, в и г). Метилирование комплементарной цепи в некоторых случаях оказывало влияние и на K_M : так, по сравнению с неметилированной комплементарной цепью эта величина повышалась в 5 раз для субстрата 4.2.1 с С на 3'-конце при однонуклеотидной бреши и снижалась в 7 раз для субстрата 3.2.4 с G на 3'-конце при 5'-концевом остатке F, однако эти изменения не носили столь систематического характера. На уровне специфичности, выраженной константой k_{sp} , удаление 3'-концевого mС из субстратов без примыкающего ОДН (1.1.5 и 1.2.5) и с разрывом (2.1.5 и 2.2.5) было наименее эффективно по сравнению с удалением других нуклеотидов вне зависимости от статуса метилирования комплементарной цепи. Однако при наличии бреши или остатка F при разрыве эффективность удаления mС из полностью метилированного субстрата (3.2.5 и 4.2.5) была сравнима с эффективностью удаления С (3.2.1 и 4.2.1; рис. 4, д и е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3'→5'-экзонуклеазная активность основной АП-эндонуклеазы человека АРЕХ1 была описана довольно давно [31–33], но долгое время счи-

позднее было установлено, что 3'→5'-экзонуклеазная активность APEX1 более специфична для некомплементарных оснований на 3'-конце субстрата типа «праймер–матрица» [6–8, 34,

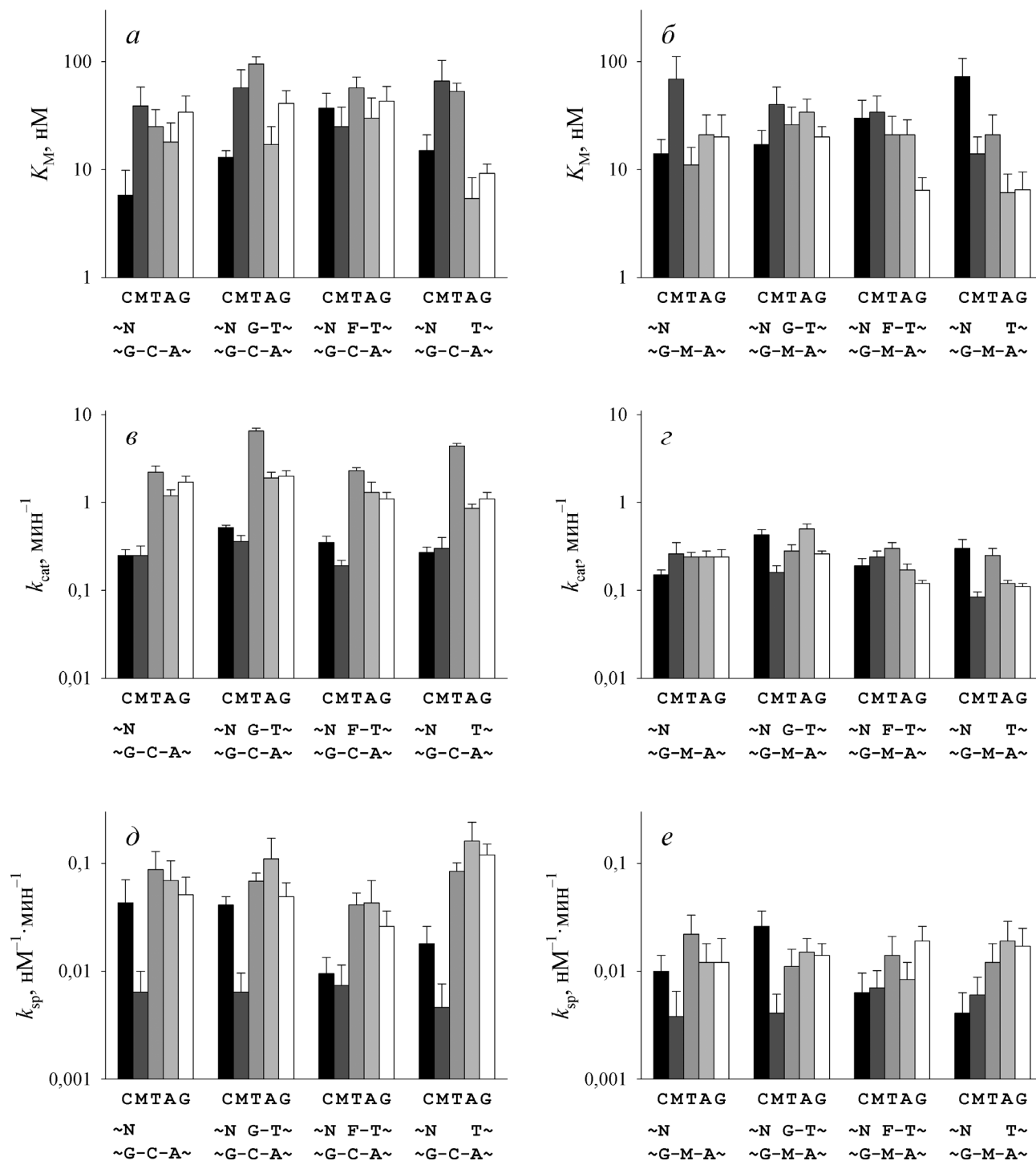


Рис. 4. Значения K_M ($a, \bar{b}$), k_{cat} ($\bar{v}, \bar{c}$) и k_{sp} ($\bar{d}, \bar{e}$) $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной реакции, катализируемой ферментом APEX1 для разных субстратов. Под каждым графиком приведены схематические изображения окружения удаляемого нуклеотида (N, природа удаляемого нуклеотида указана под соответствующими столбцами). М – 5-метилцитозин, F – 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранол-3

35], и некоторые авторы рассматривают APEx1 как фермент, участвующий в коррекции ошибок при репликативном или, что более вероятно, репаративном синтезе ДНК [6, 14]. Помимо неправильно включенных канонических нуклеотидов, корректирующая экзонуклеазная активность APEx1 удаляет из ДНК и многие 3'-концевые остатки нуклеозидных ингибиторов ДНК-полимераз и других неканонических нуклеотидов [36–40]. Недавно было показано, что в ходе репарации одноцепочечных разрывов ДНК после удаления 3'-концевого остатка ферментом APEx1 3'→5'-экзонуклеазная реакция продолжается с участием нуклеазы APEx2 – гомолога APEx1, не проявляющего заметной АП-эндонуклеазной активности [41].

В исследовании были получены данные о гидролизе 40 субстратов, которые относились к 4 структурным сериям, различающимся наличием и природой примыкающего с 3'-стороны ОДН. В каждой серии на 3'-конце субстрата находился либо нуклеотид, комплементарный G в противоположной цепи (dCMP, dmCMP), либо некомплементарный нуклеотид (dAMP, dGMP, dTMP). Следует отметить, что примыкающие олигонуклеотиды в составе субстратов не содержали 5'-концевого фосфата, который заметно снижает эффективность 3'→5'-экзонуклеазной реакции APEx1 во всех типах разрывов [8, 15, 34].

Полученные в работе результаты согласуются с литературными данными о том, что 3'→5'-экзонуклеазная активность фермента APEx1 даже для некомплементарных нуклеотидов на 3'-конце заметно ниже его АП-эндонуклеазной активности. Значения k_{cat} экзонуклеазной реакции лежали в диапазоне 0,084–6,5 мин⁻¹, в то время как для АП-эндонуклеазной реакции они составляют 1–10 с⁻¹ в стационарном режиме [42–45], т.е. выше на 1–4 порядка, а константа скорости химической стадии реакции, не осложнённой распадом комплекса фермент–продукт, по данным предстационарной кинетики, превышает 700–850 с⁻¹ [46, 47]. В случае экзонуклеазной реакции её скорость, по-видимому, лимитируется именно высвобождением продукта [35]. С другой стороны, значения k_{cat} экзонуклеазной реакции сравнимы с таковыми для действия APEx1 в так называемой «инцизионной репарации нуклеотидов» – гидролизе 5'-фосфодиэфирной связи модифицированных нуклеотидов, содержащих основания (5,6-дигидроурацил, αdA, rU) [48, 49]. Интересно, что значения K_M во всех этих случаях показывают значительно меньшую вариабельность и находятся внутри диапазона 1–100 нМ.

Наблюдавшаяся специфичность экзонуклеазной активности APEx1 по отношению к раз-

ным типам субстратной ДНК в целом согласуется с литературными данными, полученными для более узких серий аналогичных субстратов, отличающихся последовательностью на 3'-конце [6–8, 34, 35]. Как и в этих работах, все субстраты с 3'-концевыми некомплементарными нуклеотидами расщеплялись ферментом лучше, чем субстраты с 3'-концевыми комплементарными нуклеотидами. В большинстве случаев наилучшие субстраты содержали на 3'-конце dTMP в составе неправильной пары Т/Г, что ранее наблюдалось для субстратов типа «праймер–матрица» [6]. Что касается природы примыкающих ОДН, то в целом субстраты с 5'-концевым остатком F использовались ферментом несколько хуже, чем субстраты с разрывом и с однонуклеотидной брешью (рис. 4, е), однако эта разница была менее выражена по сравнению с описанными различиями, зависящими от наличия 5'-фосфата [8, 15, 34]. В тех случаях, когда возможно прямое сравнение субстратов с разными примыкающими ОДН и однотипными 5'-концами (фосфат или ОН-группа) разница в активности APEx1 между такими субстратами не превышает 2 раз [8, 15, 34]. Ряд структур комплексов APEx1 с ДНК, отражающих разные стадии экзо- и эндонуклеазной реакции, позволяет установить ключевые различия между этими двумя активностями фермента [50–55]. Для катализа АП-эндонуклеазной реакции АП-сайт переводится во внеспиральное состояние и связывается в активном центре фермента, а его фосфатная группа координируется водородными связями с остатками Tyr171, Asn174, Asn212 и His309 (рис. 5, а). При этом в спираль ДНК внедряются два боковых аминокислотных радикала: Arg177 заполняет полость, образовавшуюся при выворачивании повреждённого нуклеотида, а Met270 вклинивается напротив него между основаниями комплементарной цепи и вызывает её локальный излом в сторону большой бороздки на ~25°. Ион Mg²⁺, координируемый карбоксильными группами остатков Asp70, Glu96 и Asp308, поляризует связь Р=О в фосфатной группе АП-сайта, а роль атакующего нуклеофила выполняет молекула воды, активированная взаимодействием с карбоксильной группой остатка Asp210 (рис. 5, а). Структуры субстрата для 3'→5'-экзонуклеазной реакции до сих пор удалось получить лишь при наличии некомплементарного основания на 3'-конце в системе с одноцепочечным разрывом ДНК (аналогичной серии 2 в настоящей работе) [53, 55]. Общая организация активного центра в этом случае остаётся неизменной (рис. 5, б), однако, поскольку его объём не позволяет связать вывернутый из спирали нуклеотид с присут-

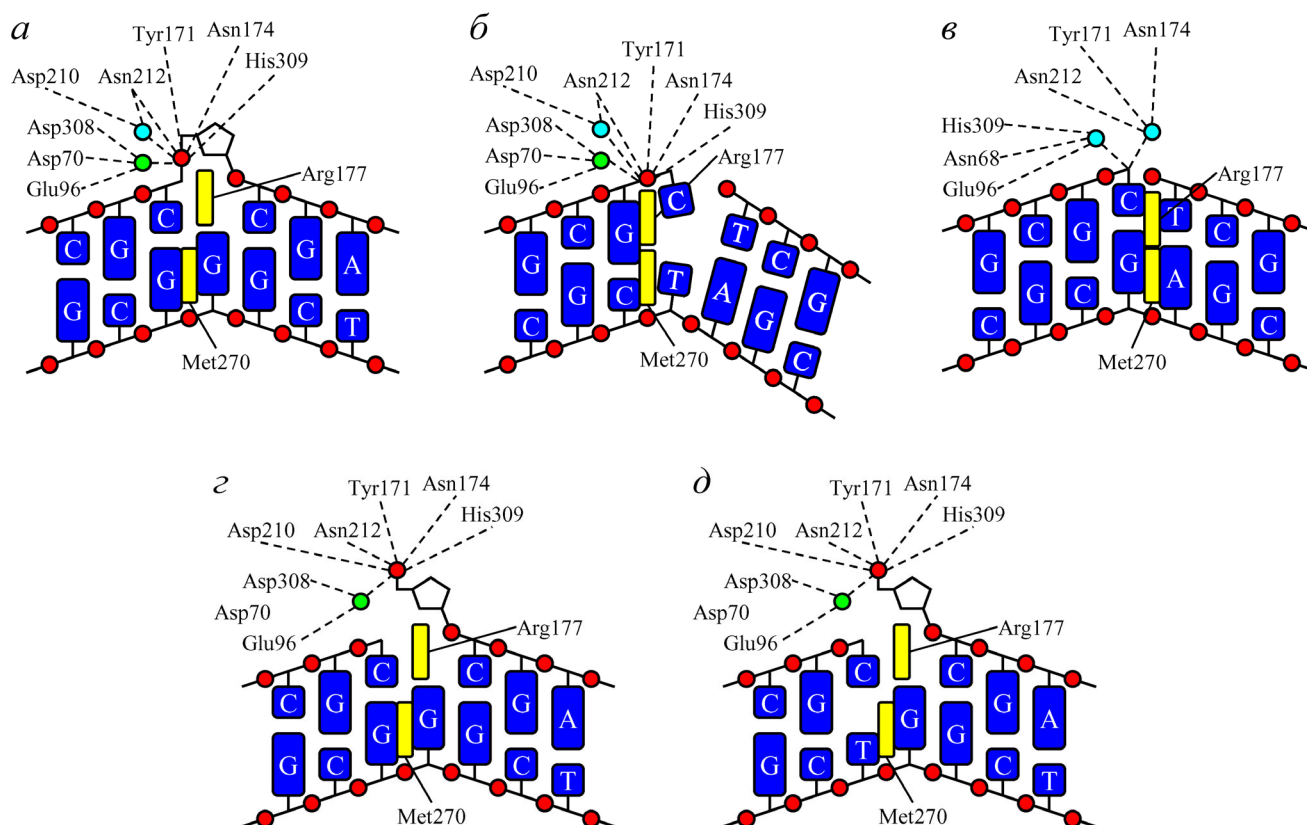


Рис. 5. Схема организации активного центра АРЕХ1 при взаимодействии фермента с ДНК, содержащей остаток F (*a*; на основе структуры 5DG0 [52]), одноцепочечный разрыв рядом с некомплементарной парой оснований C/T (*б*; на основе структуры 5WN5 [53]), одноцепочечный разрыв рядом с комплементарной парой оснований C/G (*в*; на основе структуры 5WN0 [53]), аналог интермедиата ЭРО рядом с комплементарной парой оснований C/G (*г*; на основе структуры 5DFF [52]) и аналог интермедиата ЭРО рядом с некомплементарной парой оснований C/T (*д*; на основе структуры 6W2P [55]). Голубым кружком обозначена молекула воды, зелёным — ион Mg^{2+} , красными — межнуклеозидные фосфаты

ствующим основанием, внедрение остатков Arg177 и Met270 сопровождается гораздо более выраженным локальным изломом ДНК ($\sim 65^\circ$). Возможно, именно с этим связано наблюдаемое в настоящей работе влияние mC на активность АРЕХ1: известно, что наличие C5-метильной группы в большой бороздке вызывает стерические затруднения при изломе ДНК и повышает её жёсткость [56, 57]. Если же рядом с разрывом ДНК на 3'-конце находится комплементарная пара нуклеотидов, гидролизуемая фосфодиэфирная связь в структуре располагается вне активного центра, а ион металла в таких структурах отсутствует, несмотря на его наличие в кристаллизационном растворе, заменяясь на молекулу воды (рис. 5, *в*). Arg177 и Met270 находятся в месте разрыва, взаимодействуя с ароматическими системами 3'-концевого основания и комплементарного ему основания. Этими структурными особенностями, очевидно, объясняется низкая 3'→5'-экзонуклеазная активность фермента АРЕХ1 по отношению к

субстратам с комплементарными 3'-концевыми парами.

Несмотря на то что 3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 часто наблюдается в реконструированной из рекомбинантных белков системе ЭРО [11–14], субстраты серии 3, моделирующие возникающий после действия монофункциональной ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы интермедиат ЭРО, оказались в целом наименее подходящими для её проявления (ср. значения k_{sp} на рис. 4, *д*). Со структурной точки зрения, это объясняется, скорее всего, тем, что после гидролиза фосфодиэфирной связи АП-сайт остаётся связанным в активном центре фермента, сохраняя большую часть взаимодействий с аминокислотными остатками и ионом металла, что затрудняет перенос в активный центр другого фосфата ДНК даже при наличии некомплементарной пары на 3'-конце (рис. 5, *г* и *д*). С функциональной же точки зрения, корректирующая активность АРЕХ1 в процессе ЭРО должна наблюдаться после включения ДНК-полимеразой β

неверного dNMP, что сопровождается вытеснением и удалением остатка 2'-дезоксирибо-5'-фосфата N-концевым доменом ДНК-полимеразы β [58, 59]. Поэтому для 3'→5'-экзонуклеазной реакции более актуальны, как модели ЭРО, субстраты с разрывом ДНК без модификации 5'-конца примыкающего ОДН, на которых APEX1 показывает наивысшую экзонуклеазную активность.

Комплементарный матрице 3'-концевой dmCMP удалялся ферментом APEX1 даже менее эффективно, чем dCMP. Аналогичный результат был недавно получен с использованием метода остановленного потока для субстратов типа «праймер–матрица» [35]. Поскольку пара mC/G термодинамически более стабильна, чем C/G [60, 61], это наблюдение согласуется с предположением о стабильности 3'-концевой нуклеотидной пары как ключевого фактора, определяющего эффективность 3'→5'-экзонуклеазной реакции APEX1 [34]. Однако интересно, что именно в случае F-содержащего субстрата (серия 3) разницы между удалением dmCMP и dCMP не наблюдалось. Низкая эффективность удаления dmCMP и снижение 3'→5'-экзонуклеазной активности фермента APEX1 при наличии mC в неповрежденной цепи позволяет предположить, что эта активность вряд ли играет значительную роль в активном деметилировании ДНК в клетках человека. Напротив, впол-

не вероятно, что в процессе ЭРО этап, катализируемый АП-эндонуклеазой, оптимизирован в том числе для сохранения статуса метилирования CpG-динуклеотидов. Экспериментально наблюдаемая ohoG/OGG1/APEX1-зависимая активация некоторых промоторов [16, 17, 19] может объясняться другими причинами, например, связанным с репарацией ремоделированием хроматина [62, 63] или непосредственным взаимодействием OGG1 и APEX1 с транскрипционными факторами [64–67]. Появление новых методов картирования повреждений ДНК с нуклеотидным разрешением [68–71] в сочетании с mC-специфичным секвенированием поможет в будущем прояснить связь между процессами повреждения ДНК, репарации и эпигенетической регуляции в геноме человека.

Финансирование. Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 17-14-01190П, экспериментальная биохимическая часть) и государственным заданием 0245-2021-0002 (структурный анализ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., et al. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., 1118 pp.
2. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine, 4th Edn.*, Oxford University Press, Oxford, 704 pp.
3. Stivers, J. T., and Jiang, Y. L. (2003) A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases, *Chem. Rev.*, **103**, 2729–2760, doi: 10.1021/cr010219b.
4. Kohli, R. M., and Zhang, Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation, *Nature*, **502**, 472–479, doi: 10.1038/nature12750.
5. Wu, X., and Zhang, Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 517–534, doi: 10.1038/nrg.2017.33.
6. Chou, K.-M., and Cheng, Y.-C. (2002) An exonucleolytic activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease on 3'-mismatched DNA, *Nature*, **415**, 655–659, doi: 10.1038/415655a.
7. Chou, K.-M., and Cheng, Y.-C. (2003) The exonuclease activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1): biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp₄G, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18289–18296, doi: 10.1074/jbc.M212143200.
8. Wilson, D. M., III (2003) Properties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease Ape1, *J. Mol. Biol.*, **330**, 1027–1037, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00712-5.
9. Mazur, D. J., and Perrino, F. W. (1999) Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases, *J. Biol. Chem.*, **274**, 19655–19660, doi: 10.1074/jbc.274.28.19655.
10. Albertson, T. M., Ogawa, M., Bugni, J. M., Hays, L. E., Chen, Y., et al. (2009) DNA polymerase ϵ and δ proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 17101–17104, doi: 10.1073/pnas.0907147106.
11. Kasymov, R. D., Grin, I. R., Endutkin, A. V., Smirnov, S. L., Ishchenko, A. A., et al. (2013) Excision of 8-oxoguanine from methylated CpG dinucleotides by human 8-oxoguanine DNA glycosylase, *FEBS Lett.*, **587**, 3129–3134, doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.008.
12. Beaver, J. M., Lai, Y., Xu, M., Casin, A. H., Laverde, E. E., et al. (2015) AP endonuclease 1 prevents trinucleotide repeat expansion via a novel mechanism during base excision repair, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5948–5960, doi: 10.1093/nar/gkv530.
13. Çağlayan, M., Horton, J. K., Dai, D.-P., Stefanick, D. F., and Wilson, S. H. (2017) Oxidized nucleotide insertion by pol β confounds ligation during base excision repair, *Nat. Commun.*, **8**, 14045, doi: 10.1038/ncomms14045.
14. Liu, T.-C., Lin, C.-T., Chang, K.-C., Guo, K.-W., Wang, S., et al. (2021) APE1 distinguishes DNA substrates in exonucleolytic cleavage by induced space-filling, *Nat. Commun.*, **12**, 601, doi: 10.1038/s41467-020-20853-2.
15. Wong, D., DeMott, M. S., and Demple, B. (2003) Modulation of the 3'→5'-exonuclease activity of human

- apurinic endonuclease (Ape1) by its 5'-incised abasic DNA product, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36242-36249, doi: 10.1074/jbc.M306065200.
16. Perillo, B., Ombra, M. N., Bertoni, A., Cuozzo, C., Sacchetti, S., et al. (2008) DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression, *Science*, **319**, 202-206, doi: 10.1126/science.1147674.
 17. Amente, S., Bertoni, A., Morano, A., Lania, L., Avvedimento, E. V., et al. (2010) LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription, *Oncogene*, **29**, 3691-3702, doi: 10.1038/onc.2010.120.
 18. Zuchegna, C., Aceto, F., Bertoni, A., Romano, A., Perillo, B., et al. (2014) Mechanism of retinoic acid-induced transcription: Histone code, DNA oxidation and formation of chromatin loops, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 11040-11055, doi: 10.1093/nar/gku823.
 19. Pastukh, V., Roberts, J. T., Clark, D. W., Bardwell, G. C., Patel, M., et al. (2015) An oxidative DNA "damage" and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **309**, L1367-L1375, doi: 10.1152/ajplung.00236.2015.
 20. Allgayer, J., Kitzera, N., Bartelt, S., Epe, B., and Khobta, A. (2016) Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7267-7280, doi: 10.1093/nar/gkw473.
 21. Müller, N., and Khobta, A. (2021) Regulation of GC box activity by 8-oxoguanine, *Redox Biol.*, **43**, 101997, doi: 10.1016/j.redox.2021.101997.
 22. Grin, I., and Ishchenko, A. A. (2016) An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3713-3727, doi: 10.1093/nar/gkw059.
 23. Woodruff, J., Gupta, S., Camacho, S., Parvathaneni, S., Choudhury, S., et al. (2017) A new sub-pathway of long-patch base excision repair involving 5' gap formation, *EMBO J.*, **36**, 1605-1622, doi: 10.15252/embj.201694920.
 24. Murayama, A., Sakura, K., Nakama, M., Yasuzawa-Tanaka, K., Fujita, E., et al. (2006) A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory, *EMBO J.*, **25**, 1081-1092, doi: 10.1038/sj.emboj.7601012.
 25. Cuomo, M., Keller, S., Punzo, D., Nuzzo, T., Affinito, O., et al. (2019) Selective demethylation of two CpG sites causes postnatal activation of the *Dao* gene and consequent removal of D-serine within the mouse cerebellum, *Clin. Epigenetics*, **11**, 149, doi: 10.1186/s13148-019-0732-z.
 26. Turker, M. S. (2002) Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation, *Oncogene*, **21**, 5388-5393, doi: 10.1038/sj.onc.1205599.
 27. Ehrlich, M., and Lacey, M. (2013) DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **754**, 31-56, doi: 10.1007/978-1-4419-9967-2_2.
 28. Sidorenko, V. S., Nevinsky, G. A., and Zharkov, D. O. (2007) Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease, *DNA Repair*, **6**, 317-328, doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.022.
 29. Takeshita, M., Chang, C.-N., Johnson, F., Will, S., and Grollman, A. P. (1987) Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites: model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10171-10179, doi: 10.1016/S0021-9258(18)61093-2.
 30. Kroeger, K. M., Goodman, M. F., and Greenberg, M. M. (2004) A comprehensive comparison of DNA replication past 2-deoxyribose and its tetrahydrofuran analog in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5480-5485, doi: 10.1093/nar/gkh873.
 31. Seki, S., Hatsushika, M., Watanabe, S., Akiyama, K., Nagao, K., et al. (1992) cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to *Escherichia coli* exonuclease III, *Biochim. Biophys. Acta*, **1131**, 287-299, doi: 10.1016/0167-4781(92)90027-W.
 32. Wilson, D. M., III, Takeshita, M., Grollman, A. P., and Demple, B. (1995) Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape) at abasic site analogs in DNA, *J. Biol. Chem.*, **270**, 16002-16007, doi: 10.1074/jbc.270.27.16002.
 33. Lebedeva, N. A., Khodyreva, S. N., Favre, A., and Lavrik, O. I. (2003) AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'→5'-exonuclease activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 182-187, doi: 10.1016/S0006-291X(02)02808-5.
 34. Dyrkheeva, N. S., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2006) Efficiency of exonucleolytic action of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards matched and mismatched dNMP at the 3'-terminus of different oligomeric DNA structures correlates with thermal stability of DNA duplexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 699-706, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.01.004.
 35. Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2018) Kinetic features of 3'-5' exonuclease activity of human AP-endonuclease APE1, *Molecules*, **23**, 2101, doi: 10.3390/molecules23092101.
 36. Chou, K.-M., Kukhanova, M., and Cheng, Y.-C. (2000) A novel action of human apurinic/apyrimidinic endonuclease: excision of L-configuration deoxyribonucleoside analogs from the 3' termini of DNA, *J. Biol. Chem.*, **275**, 31009-31015, doi: 10.1074/jbc.M004082200.
 37. Lam, W., Park, S.-Y., Leung, C.-H., and Cheng, Y.-C. (2006) Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 protein level is associated with the cytotoxicity of L-configuration deoxycytidine analogs (troxacitabine and β-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine) but not D-configuration deoxycytidine analogs (gemcitabine and β-D-arabinofuranosylcytosine), *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1607-1614, doi: 10.1124/mol.105.021527.
 38. Dyrkheeva, N. S., Khodyreva, S. N., Sukhanova, M. V., Safronov, I. V., Dezhurov, S. V., et al. (2006) 3'-5' exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards DNAs containing dNMP and their modified analogs at the 3' end of single strand DNA break, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 200-210, doi: 10.1134/S0006297906020131.
 39. Dyrkheeva, N. S., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2008) Quantitative parameters of the 3'-5' exonuclease reaction of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with nicked DNA containing dYMP or a modified dCMP analogue, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **34**, 192-200, doi: 10.1134/S1068162008020088.
 40. Dyrkheeva, N. S., Lebedeva, N. A., Sherstyuk, Y. V., Abramova, T. V., Silnikov, V. N., et al. (2018) Excision of carbohydrate-modified dNMP analogues from DNA 3' end by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1), *Mol. Biol. (Mosk)*, **52**, 922-928, doi: 10.1134/S0026893318060067.
 41. Lin, Y., Raj, J., Li, J., Ha, A., Hossain, M. A., et al. (2020) APE1 senses DNA single-strand breaks for repair and signaling, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 1925-1940, doi: 10.1093/nar/gkz1175.
 42. Strauss, P. R., Beard, W. A., Patterson, T. A., and Wilson, S. H. (1997) Substrate binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism, *J. Biol. Chem.*, **272**, 1302-1307, doi: 10.1074/jbc.272.2.1302.

43. Mantha, A. K., Oezguen, N., Bhakat, K. K., Izumi, T., Braun, W., et al. (2008) Unusual role of a cysteine residue in substrate binding and activity of human AP-endonuclease 1, *J. Mol. Biol.*, **379**, 28–37, doi: 10.1016/j.jmb.2008.03.052.
44. Kanazhevskaya, L. Y., Koval, V. V., Zharkov, D. O., Strauss, P. R., and Fedorova, O. S. (2010) Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair, *Biochemistry*, **49**, 6451–6461, doi: 10.1021/bi100769k.
45. Adhikari, S., Manthena, P. V., Kota, K. K., Karmahapatra, S. K., Roy, G., et al. (2012) A comparative study of recombinant mouse and human apurinic/aprimidinic endonuclease, *Mol. Cell. Biochem.*, **362**, 195–201, doi: 10.1007/s11010-011-1142-5.
46. Maher, R. L., and Bloom, L. B. (2007) Pre-steady-state kinetic characterization of the AP endonuclease activity of human AP endonuclease 1, *J. Biol. Chem.*, **282**, 30577–30585, doi: 10.1074/jbc.M704341200.
47. Schermerhorn, K. M., and Delaney, S. (2013) Transient-state kinetics of apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 acting on an authentic AP site and commonly used substrate analogs: The effect of diverse metal ions and base mismatches, *Biochemistry*, **52**, 7669–7677, doi: 10.1021/bi401218r.
48. Gros, L., Ishchenko, A. A., Ide, H., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2004) The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 73–81, doi: 10.1093/nar/gkh165.
49. Kim, S.-E., Gorrell, A., Rader, S. D., and Lee, C. H. (2010) Endoribonuclease activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 revealed by a real-time fluorometric assay, *Anal. Biochem.*, **398**, 69–75, doi: 10.1016/j.ab.2009.11.024.
50. Mol, C. D., Izumi, T., Mitra, S., and Tainer, J. A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination, *Nature*, **403**, 451–456, doi: 10.1038/35000249.
51. Tsutakawa, S. E., Shin, D. S., Mol, C. D., Izumi, T., Arvai, A. S., et al. (2013) Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes, *J. Biol. Chem.*, **288**, 8445–8455, doi: 10.1074/jbc.M112.422774.
52. Freudenthal, B. D., Beard, W. A., Cuneo, M. J., Dyrkheeva, N. S., and Wilson, S. H. (2015) Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 924–931, doi: 10.1038/nsmb.3105.
53. Whitaker, A. M., Flynn, T. S., and Freudenthal, B. D. (2018) Molecular snapshots of APE1 proofreading mismatches and removing DNA damage, *Nat. Commun.*, **9**, 399, doi: 10.1038/s41467-017-02175-y.
54. Fairlamb, M. S., Whitaker, A. M., and Freudenthal, B. D. (2018) Apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 processing of AP sites with 5' mismatches, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **74**, 760–768, doi: 10.1107/S2059798318003340.
55. Whitaker, A. M., Stark, W. J., Flynn, T. S., and Freudenthal, B. D. (2020) Molecular and structural characterization of disease-associated APE1 polymorphisms, *DNA Repair*, **91–92**, 102867, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102867.
56. Nathan, D., and Crothers, D. M. (2002) Bending and flexibility of methylated and unmethylated *EcoRI* DNA, *J. Mol. Biol.*, **316**, 7–17, doi: 10.1006/jmbi.2001.5247.
57. Teng, X., and Hwang, W. (2018) Effect of methylation on local mechanics and hydration structure of DNA, *Biophys. J.*, **114**, 1791–1803, doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.022.
58. Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R., and Wilson, S. H. (1998) Human DNA polymerase β deoxyribose phosphate lyase: substrate specificity and catalytic mechanism, *J. Biol. Chem.*, **273**, 15263–15270, doi: 10.1074/jbc.273.24.15263.
59. Sobol, R. W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X.-P., et al. (2000) The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity, *Nature*, **405**, 807–810, doi: 10.1038/35015598.
60. Hoheisel, J. D., Craig, A. G., and Lehrach, H. (1990) Effect of 5-bromo- and 5-methyldeoxycytosine on duplex stability and discrimination of the *NotI* octadeoxynucleotide: quantitative measurements using thin-layer chromatography, *J. Biol. Chem.*, **265**, 16656–16660, doi: 10.1016/S0021-9258(17)46271-5.
61. Lebedev, Y., Akopyants, N., Azhikina, T., Shevchenko, Y., Potapov, V., et al. (1996) Oligonucleotides containing 2-aminoadenine and 5-methylcytosine are more effective as primers for PCR amplification than their nonmodified counterparts, *Genet. Anal.*, **13**, 15–21, doi: 10.1016/1050-3862(96)00139-8.
62. Menoni, H., Gasparutto, D., Hamiche, A., Cadet, J., Dimitrov, S., et al. (2007) ATP-dependent chromatin remodeling is required for base excision repair in conventional but not in variant H2A. Bbd nucleosomes, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 5949–5956, doi: 10.1128/MCB.00376-07.
63. Azzouz, D., Khan, M. A., and Palaniyar, N. (2021) ROS induces NETosis by oxidizing DNA and initiating DNA repair, *Cell Death Discov.*, **7**, 113, doi: 10.1038/s41420-021-00491-3.
64. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.-C. E., and Curran, T. (1992) Redox activation of Fos–Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme, *EMBO J.*, **11**, 3323–3335, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05411.x.
65. Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., et al. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α , *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 402–415, doi: 10.1128/MCB.20.1.402-415.2000.
66. Ando, K., Hirao, S., Kabe, Y., Ogura, Y., Sato, I., et al. (2008) A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4327–4336, doi: 10.1093/nar/gkn416.
67. Fleming, A. M., Ding, Y., and Burrows, C. J. (2017) Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2604–2609, doi: 10.1073/pnas.1619809114.
68. Liu, Z. J., Martínez Cuesta, S., van Delft, P., and Balasubramanian, S. (2019) Sequencing abasic sites in DNA at single-nucleotide resolution, *Nat. Chem.*, **11**, 629–637, doi: 10.1038/s41557-019-0279-9.
69. Fang, Y., and Zou, P. (2020) Genome-wide mapping of oxidative DNA damage via engineering of 8-oxoguanine DNA glycosylase, *Biochemistry*, **59**, 85–89, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00782.
70. Gorini, F., Scala, G., Di Palo, G., Dellino, G. I., Cocozza, S., et al. (2020) The genomic landscape of 8-oxodG reveals enrichment at specific inherently fragile promoters, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4309–4324, doi: 10.1093/nar/gkaa175.
71. Roychoudhury, S., Pramanik, S., Harris, H. L., Tarpley, M., Sarkar, A., et al. (2020) Endogenous oxidized DNA bases and APE1 regulate the formation of G-quadruplex structures in the genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11409–11420, doi: 10.1073/pnas.1912355117.

DNA METHYLATION AFFECTS THE 3'→5' EXONUCLEASE ACTIVITY OF THE MAJOR HUMAN ABASIC SITE ENDONUCLEASE, APEX1**A. V. Endutkin¹, D. D. Yatsenko¹, and D. O. Zharkov^{1,2*}**¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*² *Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Apurinic/aprimidinic (AP) endonucleases are key enzymes in the DNA base excision repair pathway that hydrolyze the phosphodiester bond of the AP site formed after the removal of a damaged base. The major human AP endonuclease APEX1 additionally possesses 3'-phosphodiesterase and 3'→5' exonuclease activities. The biological roles of the latter are not established at present; it is assumed to correct errors in the DNA repair synthesis. If DNA is damaged 3' of a 5-methylcytosine (mC) residue, the 3'→5' exonuclease activity can change the epigenetic methylation status of the CpG dinucleotide. It remains unclear whether the 3'→5' exonuclease activity of APEX1 contributes to the process of active epigenetic demethylation or, on the contrary, is limited in methylated CpG dinucleotides to preserve the epigenetic status during the repair of accidental DNA damage. Here we report the first systematic study of the efficiency of removal of 3'-terminal nucleotides from substrates modeling DNA repair intermediates in CpG dinucleotides. In all intermediates, oligonucleotides with 3'-terminal bases non-complementary to the template were the best, and those with mC, the worst substrates for the 3'→5' exonuclease activity of APEX1. The presence of mC in the complementary strand significantly reduced the reaction rate even for non-complementary 3'-termini. Thus, the efficiency of the 3'→5' exonuclease reaction catalyzed by APEX1 is limited in the methylated CpG context, which likely reflects the need to maintain the epigenetic status during the repair.

Keywords: DNA damage, DNA repair, epigenetic demethylation, AP endonuclease, 3'→5' exonuclease, APEX1, 5-methylcytosine

УДК 577.322.52

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНЫХ ШАПЕРОНИНОВ

Обзор

© 2022 Л.П. Курочкина^{1*}, П.И. Семенюк¹, О.С. Соколова²

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lpk56@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.11.2021

После доработки 06.12.2021

Принята к публикации 06.12.2021

Шаперонины обеспечивают правильное сворачивание (фолдинг) белков *in vivo* и *in vitro* и, как считалось до недавнего времени, свойственны прокариотам, эукариотам и археям. Однако оказалось, что и некоторые вирусы бактерий (бактериофаги) кодируют собственные шаперонины. В данном обзоре представлены результаты исследований первых представителей этой новой группы шаперонинов: двухкольцевого шаперонина EL и однокольцевых шаперонинов OBP и AR9. Проведен сравнительный анализ биохимических свойств и структуры фаговых шаперонинов между собой и с другими известными шаперонинами I и II групп.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: шаперонин, бактериофаг, пространственная структура, криоэлектронная микроскопия, кристаллография.

DOI: 10.31857/S032097252201002X

ВВЕДЕНИЕ

Сворачивание (фолдинг) многих белков с образованием уникальной нативной структуры возможно только при участии молекулярных шаперонов [1–5]. Одним из наиболее изученных классов молекулярных шаперонов являются шаперонины, которые встречаются во всех царствах живой природы. Они помогают правильно сворачиваться как новосинтезированным полипептидным цепям, так и денатурированным под воздействием стресса белкам за счет энергии гидролиза АТФ [6]. Нарушение функций шаперонинов приводит к нарушению сворачивания белков, участвующих в широком спектре клеточных процессов. Патогенные мутации или абберантные посттрансляционные модификации, влияющие на структуру и функцию шаперонинов, вызывают так называемые шаперонинопатии [7]. Это, в свою очередь, может повлиять на большинство жизненно важных процессов, происходящих на уровне всего организма, и стать причиной онкологических, аутоиммунных, нейродегенеративных заболева-

ний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, и других патологических состояний [8–10].

Шаперонины – очень консервативные белки, имеющие характерную архитектуру (рис. 1). Они, как правило, состоят из двух состыкованных «спина к спине» колец, каждое из которых содержит 7–9 субъединиц (молекулярная масса отдельных субъединиц составляет около 60 кДа), образующих полый бочонок, внутри которого и происходит сворачивание белков-субстратов. Шаперонины принято делить на две группы (таблица). К группе I относятся шаперонины прокариот (в частности, наиболее изученный GroEL *Escherichia coli*) и эукариотических органелл – митохондрий (Hsp60) и хлоропластов (Cpn60) [11–13]. К группе II относятся шаперонины цитозоля архей (термосома) и эукариот (TRiC/CCT) [14]. Шаперонины I группы являются гомоолигомерными комплексами, содержащими по 7 субъединиц в каждом кольце. Шаперонины II группы чаще всего представляют собой гетероолигомеры, кольца которых состоят из 8 или 9 различных, но гомологичных субъединиц. Кольца шаперонинов различаются взаимным расположением субъединиц: у шаперонинов I группы каждая субъединица одного кольца взаимодействует с двумя субъединицами

* Адресат для корреспонденции.

Сравнение вирусных шаперонинов с шаперонинами I и II групп

	Группа I			Группа II		Вирусные шаперонины	
Локализация	бактерии	митохондрии	хлоропласты	археи	цитозоль эукариот	бактериофаги	
Название	GroEL	Hsp60	Cpn60	термосома	TRiC (CCT)	EL	OBP, AR9
Кошаперонин	GroES	Hsp10	Cpn10/20	—	—	—	—
Количество типов субъединиц	1	1	2	2 или 3	8	1	1
Олигомеризация	2 × 7	2 × 7	2 × 7	2 × 8 или 2 × 9	2 × 8	2 × 7	1 × 7
Расположение субъединиц между кольцами	1 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 1	1 : 1	1 : 1	—

противоположного кольца (1 : 2), а у шаперонинов II группы каждая субъединица одного кольца взаимодействует только с одной субъединицей другого (1 : 1). Однако главным отличием между шаперонинами двух групп является то, что шаперонины I группы функционируют в паре с другими белками, кошаперонинами: GroES — в бактериях, Hsp10 — в митохондриях и Cpn10/20 — в хлоропластах [15–17]. Кошаперонины состоят из 7 идентичных субъединиц (масса субъединицы около 10 кДа; у хлоропластов встречаются кошаперонины с массой субъединиц около 20 кДа) и имеют куполообразную форму. В процессе функционирования кошаперонин как «крышка» закрывает с торца внутреннюю полость шаперонина, в которой происходит сворачивание белка. Шаперонины II груп-

пы функционируют без кошаперонинов: роль «крышки» у них выполняют встроенные в апикальные домены длинные альфа-спирали, которые меняют свое положение на разных стадиях реакционного цикла, тем самым открывая или закрывая внутреннюю полость [18, 19]. На основании структурных и биохимических исследований установлено, что в реакционном цикле шаперонины I и II групп претерпевают АТФ-зависимые переходы между открытой и закрытой конформациями.

Специфика масштабных конформационных перестроек, происходящих в процессе функционирования шаперонинов, обусловлена структурой их субъединиц (рис. 1). У шаперонинов обеих групп каждая субъединица состоит из трех доменов: апикального, который распознает и

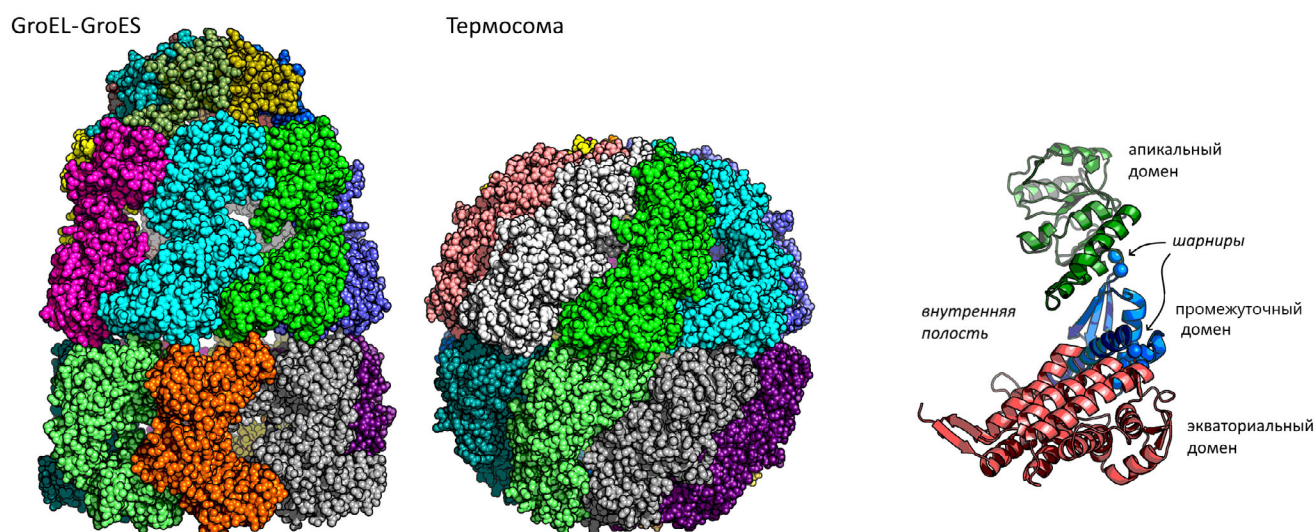


Рис. 1. Кристаллические структуры комплекса GroEL–GroES (группа I) и термосомы (группа II); коды PDB: 1aon и 1ab6 соответственно; субъединицы окрашены разными цветами; справа — трехдоменная организация субъединицы GroEL

связывает субстрат (а у шаперонинов I группы — еще и кошаперонин); экваториального, который содержит АТР-связывающий сайт и ответственен за внутри- и межкольцевые контакты субъединиц; и промежуточного, соединяющего два вышеупомянутых домена. Промежуточный домен обеспечивает передачу конформационных изменений, инициированных связыванием нуклеотида, от экваториального домена к апикальному [20, 21].

ФИЛОГЕНИЯ ФАГОВЫХ ШАПЕРОНИНОВ

Шаперонины были открыты в 1970-х годах, когда в процессе генетических исследований различных штаммов *E. coli* был идентифицирован ген, мутации в котором влияли на способность клеток поддерживать рост бактериофагов [22–25]. Продукт этого бактериального гена назвали шаперонином GroEL. Было установлено, что ряд бактериофагов, лямбда, T5, PRD1, Mu и другие, для сборки белков капсида или/и хвоста использует клеточную систему шаперонинов GroEL–GroES [26–29]. У некоторых фагов функцию кошаперонина выполняют их собственные белки, ортологи GroES: например, в фаге T4 — продукт гена (gene product, gp) 31 [30], а в фаге RB49 — SocO [31]. Более того, оказалось, что бактериофаги могут кодировать и собственные шаперонины. Так, ген, кодирующий гомолог GroEL, был впервые обнаружен в 2005 г. в геноме гигантского бактериофага EL *Pseudomonas aeruginosa* [32]. Позже гены, кодирующие GroEL-подобные белки, были найдены у других фагов, и число таких белков-кандидатов, потенциально являющихся шаперонинами, растет по мере депонирования в базу данных GenBank последовательностей геномной ДНК новых бактериофагов [33–36].

Как показал анализ метагеномных последовательностей из различных популяций вириопланктона, литические и умеренные бактериофаги, несущие гены шаперонинов, сравнительно широко распространены в морских экосистемах [37]. Многие из этих бактериофагов кодируют гомологи GroEL и GroES, а часть бактериофагов кодирует только GroEL-подобные шаперонины. По своей последовательности эти шаперонины значительно отличаются от последовательностей бактериальных шаперонинов, из чего следует, что бактериофаги несут этот ген в течение длительного эволюционного времени. Интересно также, что у некоторых бактериофагов были найдены потенциальные шаперонины, филогенетически близкие к термосомам архей, а не шаперонинам I группы, что может являться

указанием на давние эволюционные взаимосвязи между хвостатыми бактериофагами и вирусами архей.

Биоинформатический анализ ряда GroEL-подобных белков, предсказанных на основе известных к настоящему времени последовательностей геномов бактериофагов, показал, что подобно всем известным шаперонинам они имеют трехдоменную организацию и содержат в целом консервативный сайт связывания АТР, который больше похож на нуклеотид-связывающий сайт шаперонинов I группы. Кроме того, аминокислотные последовательности этих белков, как и шаперонинов I группы, не содержат в апикальном домене дополнительной спиральной вставки — встроенной «крышки», характерной для представителей II группы [38]. На эволюционную близость фаговых шаперонинов к шаперонинам I группы указывает также их расположение на филогенетическом древе (рис. 2) [39]. Однако у них имеются и некоторые отличия: в частности, аминокислотные остатки, которые по аналогии с бактериальным GroEL отвечают за межкольцевые взаимодействия субъединиц, не консервативны у предсказанных фаговых шаперонинов. Необходимо также отметить, что фаговые шаперонины нельзя объединить в одну монофилетическую группу, поскольку они существенно различаются между собой.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФАГОВЫХ ШАПЕРОНИНОВ

Для изучения структурных и функциональных особенностей фаговых шаперонинов нами были получены и охарактеризованы различными физико-химическими методами рекомбинантные GroEL-подобные белки гигантских бактериофагов: EL *Pseudomonas aeruginosa* [40], OBP *Pseudomonas fluorescens* [38] и AR9 *Bacillus subtilis* [39]. С помощью аналитического ультрацентрифугирования и электронной микроскопии было установлено, что они имеют разную архитектуру. Подобно большинству известных шаперонинов белок фага EL имеет двухкольцевую морфологию: каждое из его колец состоит из 7 субъединиц gp146 (558 а.о., 61,68 кДа). В отличие от тетрадекамера EL, шаперонины фагов OBP и AR9 представляют собой однокольцевые гептамеры, состоящие из субъединиц gp246 (520 а.о., 57,75 кДа) и gp228 (562 а.о., 63,75 кДа) соответственно. Однокольцевые шаперонины менее изучены по сравнению с двухкольцевыми. Однако известно, что однокольцевые формы мутантного шаперонина GroEL [41–43] и митохондриального шаперонина

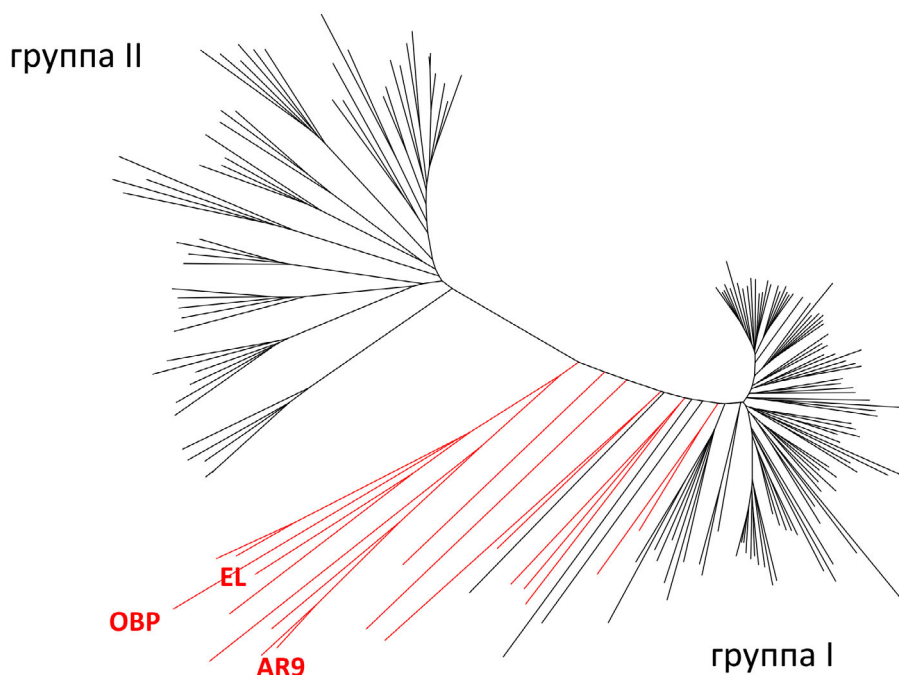


Рис. 2. Расположение фаговых шаперонинов (красный цвет) среди шаперонинов I и II групп (черный цвет) на филогенетическом древе

[44–45] обладают функциональной активностью. Более того, сравнительно недавно было установлено, что в АТРазном цикле бактериальной системы GroEL–GroES происходит временное разделение колец шаперонина [46], а в реакционном цикле митохондриального шаперонина, mHsp60–mHsp10, одновременно функционируют как однокольцевые, так и двухкольцевые формы [47].

С целью изучения функциональной активности фаговых шаперонинов был проведен поиск их потенциальных белков-субстратов среди фаговых белков. С использованием сыворотки на рекомбинантные белки (gp146 и gp246) мы показали, что гены, кодирующие шаперонины, экспрессируются *in vivo* при инфицировании бактериальных клеток *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* фагами EL и OBP соответственно [38, 40]. С помощью метода иммунопреципитации из клеток *P. aeruginosa*, инфицированных фагом EL, был выделен gp146, а также его возможные комплексы с белками-субстратами. С помощью масс-спектрометрии был идентифицирован белок-субстрат – фаговый эндолизин (gp188). Эндолизин является ферментом, который участвует в лизисе клетки-хозяина в конце репликационного цикла бактериофага. Разрушая изнутри пептидогликановый слой бактериальной клетки, он обеспечивает выход образовавшихся фаговых частиц наружу.

Ген 188 был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* [40]. Рекомбинантный gp188 (308 а.о., 34,29 кДа) был использован в опытах *in vitro* для изучения биологической активности фаговых шаперонинов. В качестве белка-субстрата мы также использовали рекомбинантный эндолизин бактериофага OBP – gp279 (342 а.о., 38,17 кДа) [38].

Было показано, что, несмотря на различия в архитектуре, все три фаговых шаперонина обладают шаперонной активностью: в присутствии АТФ они способны сворачивать денатурированные фаговые эндолизины, восстанавливая их ферментативную активность [39]. Для фаговых шаперонинов характерна и шапероноподобная активность: они защищают белки-субстраты от термической агрегации АТФ-зависимым способом [40]. При этом двухкольцевой шаперонин EL, подобно шаперонину GroEL [48], способен предотвращать агрегацию эндолизина и в отсутствие АТФ за счет образования стабильного долгоживущего комплекса с его развернутыми под воздействием температуры полипептидными цепями [40, 49]. Однокольцевые шаперонины функционируют только в присутствии АТФ. Все три фаговых шаперонина обладают слабой АТРазной активностью [39]. Важно отметить, что для функционирования фаговым шаперонами не требуются кошаперонины. Видимо, по этой причине при масс-спектрометрических

исследованиях среди фаговых и клеточных белков не был обнаружен кандидат на роль кошаперонина.

СТРУКТУРА ОДНОКОЛЬЦЕВОГО ШАПЕРОНИНА ОВР

На основе изображений, полученных с помощью криоэлектронной микроскопии, определена структура однокольцевого шаперонина ОВР в апо-форме, а также в связанных с АТР γ S (медленно гидролизующийся аналог АТР) и АДФ состояниях с разрешением 4,3 Å, 5,0 Å и 6,0 Å

соответственно [50]. Интересно, что в апо-форме ОВР вращательная симметрия C_7 наблюдается только на уровне экваториальных доменов. В области промежуточного домена симметрия нарушается, а на уровне апикальных доменов наблюдается ярко выраженная асимметрия: гептамер состоит из трех пар субъединиц (обозначенных условно как *A* и *B*) и одной непарной субъединицы (*C*). В каждой паре субъединицы *A* и *B* имеют разную конформацию, а субъединица *C*, которая разрешена в структуре хуже из-за своей подвижности, по-видимому, способна принимать разные конформации между конформациями *A* и *B* (рис. 3, *a*).

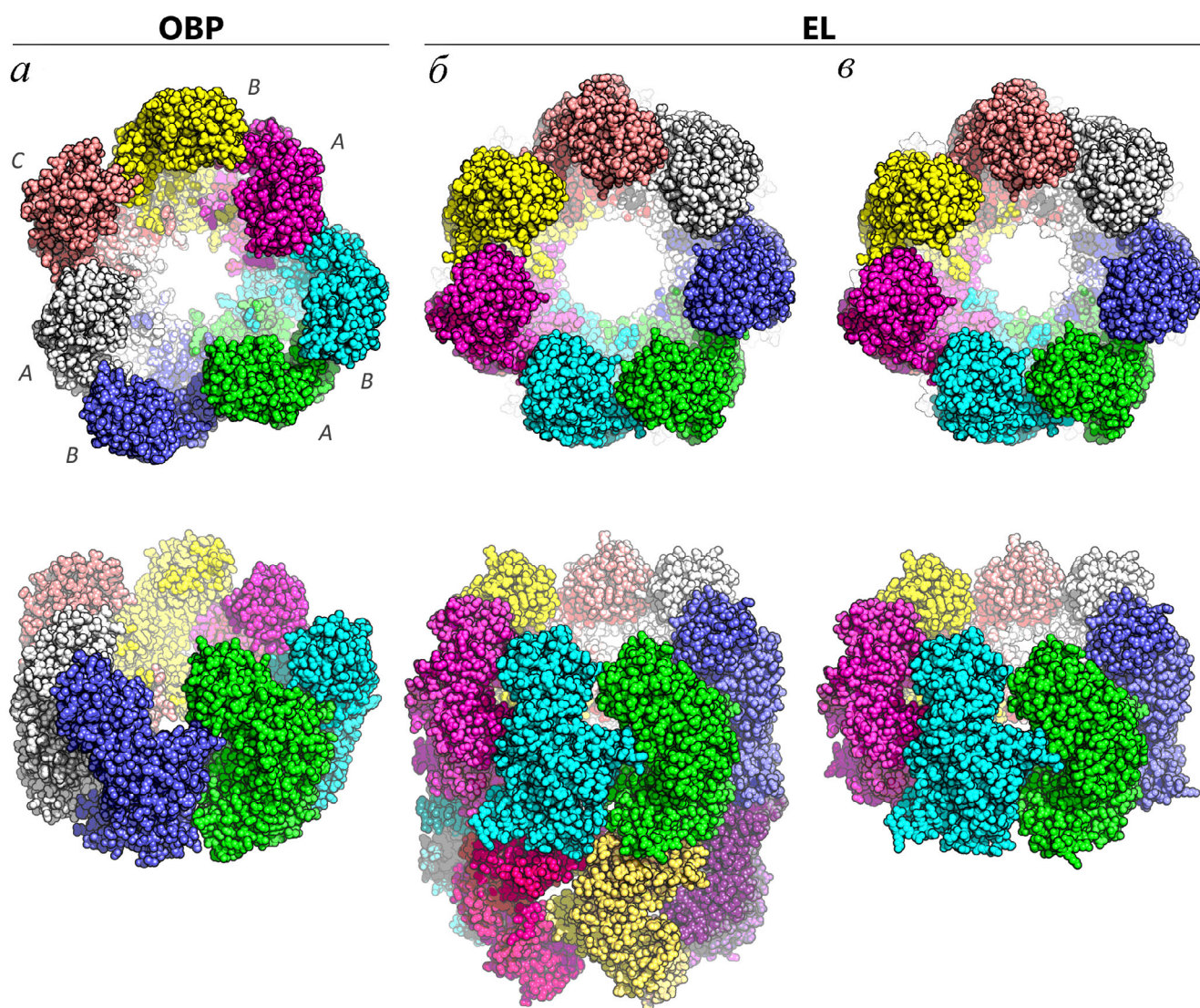


Рис. 3. Сравнение структур однокольцевого шаперонина ОВР и двухкольцевого шаперонина EL (верхний ряд — вид сверху, нижний — вид сбоку под углом); субъединицы окрашены разными цветами. *a*, *б* — Апо-формы шаперонинов ОВР и EL, полученные с помощью криоэлектронной микроскопии; коды PDB: 6hdd и 6tmv соответственно. Субъединицы ОВР, образующие три пары, обозначены буквами *A* и *B*, а непарная подвижная субъединица — буквой *C*. *в* — Кристаллическая структура шаперонина EL в присутствии АТР–BeF $_3$; код PDB: 6tmu

На основе кристаллической структуры GroEL с учетом 17%-ной идентичности аминокислотных последовательностей GroEL и gp246 для субъединиц *A* и *B* были построены атомные модели, которые затем встраивали в карту плотности гептамера. Сравнение полученных моделей со структурой субъединицы шаперонина GroEL в разных конформационных состояниях позволило установить, что субъединица *A* шаперонина OBP похожа на состояние T (низкая аффинность к АТР), которое соответствует закрытой конформации GroEL, а субъединица *B* больше похожа на состояние Rsl (АТР-связанное состояние), которое соответствует открытой конформации GroEL. Таким образом, в отличие от GroEL, в апо-форме шаперонина OBP субъединицы присутствуют одновременно в двух конформациях. В пользу этого могут свидетельствовать экспериментальные данные, полученные нами с помощью метода изотермической титрационной калориметрии. Кривые титрования шаперонина различными нуклеотидами (АТР, АDP, АТР γ S) соответствуют модели «два набора сайтов связывания». Это означает, что субъединицы шаперонина имеют два типа нуклеотид-связывающих сайтов, различающихся константами связывания и тепловым эффектом [38, 39].

Известно, что в GroEL переход из состояния T в состояние Rsl обусловлен функционированием нижнего шарнира, соединяющего промежуточный и экваториальный домены субъединицы (рис. 1) [51]. Такой переход происходит одновременно во всех субъединицах одного кольца (положительная внутрикольцевая кооперативность) [52]. Аминокислотные остатки Pro137 и Gly410, формирующие этот шарнир в GroEL, консервативны в шаперонине OBP, что обеспечивает вращение апикального и промежуточного доменов относительно экваториального домена для каждой его субъединицы.

Наряду с нижним шарниром в GroEL функционирует еще и верхний шарнир, который соединяет промежуточный домен с апикальным. Согласованное вращение апикальных доменов всех субъединиц приводит к открыванию/закрыванию внутренней полости шаперонина в процессе его АТР-цикла. В GroEL верхний шарнир сформирован высококонсервативными остатками Gly192 и Gly375 [53–55]. В шаперонине OBP соответствующие остатки Gly замещены на большие полярные остатки Glu191 и Asn376, поэтому верхний шарнир в OBP не функционален. Более того, некоторые солевые мостики, играющие ключевую роль в функционировании GroEL, отсутствуют в шаперонине OBP. Вместо них появляется новый набор солевых мостиков между промежуточным доменом

субъединицы *A* и апикальным доменом субъединицы *B* внутри каждой пары субъединиц. Между парами такие межсубъединичные взаимодействия отсутствуют, вследствие чего и наблюдается асимметричная картина в верхней части шаперонина OBP (рис. 3, *a*).

На основе криоэлектронных изображений получены структуры апо-формы другого однокольцевого шаперонина, AR9: без наложения симметрии – с разрешением 4,5 Å и при наложении симметрии C7 – с разрешением 4,0 Å. В отличие от OBP, для AR9 характерна менее выраженная асимметрия субъединиц, хотя на уровне апикальных и промежуточных доменов наблюдается структурная гетерогенность [56, 57].

СТРУКТУРА ДВУХКОЛЬЦЕВОГО ШАПЕРОНИНА EL

Ранние исследования структуры с помощью криоэлектронной микроскопии позволили реконструировать модели шаперонина EL в апо-форме с разрешением 9 Å и в связанных с АТР и АDP состояниях с разрешением 6,8 Å и 11,7 Å соответственно [58]. В отсутствие нуклеотидов и в связанном с АТР состоянии шаперонин имеет двухкольцевую морфологию, при этом расположение его субъединиц на межкольцевом интерфейсе такое же, как у шаперонинов II группы – 1 : 1, а не ступенчатое – 1 : 2, как у GroEL. В апо-форме оба кольца шаперонина EL имеют закрытую конформацию, а в АТР-связанном состоянии оба кольца находятся в открытой конформации, способной связывать белок-субстрат. АDP-связанная форма имеет однокольцевую сфероподобную структуру, что предполагает разделение колец в процессе функционирования шаперонина. Согласно предложенному в 2016 г. гипотетическому механизму АТР-цикла шаперонина EL неправильно свернутый белок-субстрат входит во внутреннюю полость каждого из двух связанных с АТР колец и запускает процесс гидролиза АТР, в результате чего происходит перемещение экваториальных доменов в субъединицах, приводящее к разделению колец шаперонина [58].

Объем внутренней полости в каждом однокольцевом комплексе увеличивается почти вдвое, а за счет перестройки апикальных доменов белок-субстрат инкапсулируется во внутренней камере. После диссоциации АDP происходит реассоциация колец с образованием двухкольцевой апо-формы. Связывание АТР вновь открывает внутреннюю полость, позволяя свернутому субстрату выйти наружу, и цикл начинается снова. Таким образом, оба разделившихся

кольца шаперонина EL активны и способны сворачивать белок-субстрат одновременно. При этом между кольцами шаперонина EL отсутствует отрицательный кооперативный эффект, характерный для бактериального шаперонина GroEL, в котором согласно ранее предложенной «bullet»-модели два кольца работают поочередно подобно двухтактному двигателю [59].

Недавние исследования структуры шаперонина EL не подтвердили образования в присутствии ADP сфероподобных однокольцевых комплексов, в которых, как предполагали ранее [58], происходит инкапсулирование белка-субстрата. Напротив, было показано, что дестабилизация межкольцевых взаимодействий в шаперонине EL, приводящая к диссоциации его колец, происходит в присутствии АТР и только при физиологической концентрации соли (100 мМ KCl); при более низкой концентрации соли (50 мМ KCl) двухкольцевая морфология сохраняется [60].

На основе криоэлектронных изображений получена структура шаперонина EL в разных состояниях [60]. Шаперонин в комплексах с ADP и АТР γ S (разрешение 5,9 Å и 5,8 Å соответственно) имеет двухкольцевую морфологию, причем оба кольца находятся в открытой конформации. Более высокое разрешение (3,45 Å) структуры апо-формы шаперонина EL позволило выявить асимметричную структуру его колец (рис. 3, б) [60].

Структуры двух разных форм однокольцевого шаперонина EL в открытой конформации были также решены кристаллографическими методами. Кристаллическая форма I (разрешение 4,03 Å) имела симметричную структуру, состоящую из однородных субъединиц в АТР-связанной конформации. Кристаллическая форма II (разрешение 3,54 Å) была асимметрична: субъединицы, имеющие АТР-связанную конформацию, чередовались с субъединицами в ADP-связанной конформации (рис. 3, в), что похоже на структуру колец апо-формы шаперонина EL (рис. 3, б). Следует отметить, что подобная структура с чередующимися субъединицами ранее была установлена нами для апо-формы однокольцевого шаперонина OBP (рис. 3, а) [50].

АТРАЗНЫЙ ЦИКЛ ВИРУСНЫХ ШАПЕРОНИНОВ

На основании полученных реконструкций предложена гипотетическая модель АТРАЗного цикла шаперонина EL [60], согласно которой двухкольцевая апо-форма с асимметричной ори-

ентацией апикальных доменов имеет низкое сродство к белку-субстрату. Связывание АТР инициирует разделение колец, при этом однокольцевая форма имеет симметричную топологию апикальных доменов и обладает высокой аффинностью к белку-субстрату. Гидролиз АТР, скорее всего, происходит в две стадии: сначала АТР гидролизруется в трех чередующихся субъединицах, в результате чего конформация кольца становится похожей на апо-состояние. При этом может быть ослаблено взаимодействие со связанным белком-субстратом, что приводит к его частичному высвобождению. На следующем этапе происходит гидролиз АТР в оставшихся четырех субъединицах с последующей диссоциацией ADP, что генерирует образование двухкольцевой апо-формы и завершает высвобождение и сворачивание субстрата. На всех этапах шаперонин EL находится в открытой конформации.

Так же, как и в шаперонине EL, связывание нуклеотидов приводит к увеличению конформационной вариабельности субъединиц в однокольцевом шаперонине OBP [50]. В связанном с АТР γ S или ADP состоянии на уровне апикальных доменов асимметрия сохраняется, но, в отличие от апо-формы, статичной остается только одна пара субъединиц A и B, остальные субъединицы становятся динамическими, что может повлиять на связывание и сворачивание белка-субстрата. Невозможность вращения апикальных доменов шаперонина OBP исключает наличие механизма закрывания внутренней полости для инкапсулирования субстрата. Размер внутренней полости при связывании нуклеотида увеличивается незначительно, что указывает на то, что шаперонин OBP во всех состояниях находится в открытой конформации, как и шаперонин EL.

Таким образом, в процессе функционирования вирусные шаперонины претерпевают нуклеотид-зависимые конформационные переходы, защищая белок-субстрат от агрегации без его инкапсулирования. На основании этого можно выдвинуть предположение о том, что фаговые шаперонины представляют собой эволюционно более древние предшественники шаперонинов I и II групп, функционирующих по более сложному механизму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение шаперонинов, кодируемых вирусами бактерий, началось сравнительно недавно, и на сегодняшний день детально охарактеризовано только три шаперонина, кодируемых гигантскими бактериофагами: EL *P. aeruginosa*, OBP

P. fluorescens и AR9 *B. subtilis*. Сравнение их по структуре и свойствам с другими известными шаперонинами позволяет предположить, что фаговые шаперонины имеют свои характерные особенности (таблица). Фаговые шаперонины, в отличие от шаперонинов I группы, функционируют без кошаперонинов и не имеют встроеной «крышки», как у шаперонинов II группы. Эта уникальная особенность указывает на то, что их механизм функционирования отличается от механизма функционирования известных шаперонинов I и II групп.

Общепризнано, что главная функция любого шаперонина заключается в том, что он предоставляет белку-субстрату свою внутреннюю полость, куда временно заключаются одна молекула субстрата. Чтобы избежать аберрантных взаимодействий, которые могут привести к агрегации белка-субстрата, сворачивание его протекает изолированно. Поэтому шаперонины I и II групп при функционировании претерпевают АТР-зависимые переходы между открытой и закрытой конформациями. В отличие от них, фаговые шаперонины независимо от состояния (апо-форма или комплексы с нуклеотидами) находятся в открытой конформации. Можно предположить, что на разных стадиях их АТР-зависимого цикла исключается инкапсулирование белка-субстрата, то есть изоляция его от внешней среды. Это характерно как для однокольцевых, так и для двухкольцевых шаперонинов. Разница между ними заключается в том, что в процессе функционирования у двухкольцевых шаперонинов происходит разделение колец.

Как отмечалось выше, бактериальный GroEL способен пассивно защищать белки-субстраты от термической инактивации за счет образования стабильного комплекса с развернутыми молекулами субстрата [48]. В отсутствие кошаперонина GroES инкапсулирования субстрата не происходит, поэтому в этом случае GroEL не восстанавливает биологическую активность денатурированного белка-субстрата [61]. Вопрос о том, каким образом фаговые шаперонины сворачивают денатурированный эндолизин с восстановлением ферментативной активности без его инкапсулирования, пока остается открытым.

Для более полного понимания механизма функционирования необходимо дальнейшее детальное изучение структуры и биохимических свойств как уже охарактеризованных, так и новых представителей шаперонинов, кодируемых вирусами бактерий.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00605) в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

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

- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature*, **381**, 571-579, doi: 10.1016/0959-440x(95)80014-r.
- Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones, *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 603-647, doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.603.
- Ellis, R. J. (2006) Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding, *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 395-401, doi: 10.1016/j.tibs.2006.05.001.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 323-355, doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2020) Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones, *FEBS Lett.*, **594**, 2770-2781, doi: 10.1002/1873-3468.13844.
- Horwich, A. L., and Fenton, W. A. (2020) Chaperonin-assisted protein folding: a chronologue, *Q. Rev. Biophys.*, **53**, e4, 1-127, doi: 10.1017/S0033583519000143.
- Vilasi, S., Bulone, D., Caruso Bavisotto, C., Campanella, C., Marino Gammazza, A., et al. (2017) Chaperonin of Group I: oligomeric spectrum and biochemical and biological implications, *Front. Mol. Biosci.*, **4**, 99, doi: 10.3389/fmolb.2017.00099.
- Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333-366, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- Tittelmeier, J., Nachman, E., and Nussbaum-Krammer, C. (2020) Molecular chaperones: a double-edged sword in neurodegenerative diseases, *Front. Aging Neurosci.*, **12**, 581374, doi: 10.3389/fnagi.2020.581374.
- Hartl, F. U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature*, **475**, 324-332, doi: 10.1038/nature10317.
- Hayer-Hartl, M. K., Martin, J., and Hartl, F. U. (1995) Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding, *Science*, **269**, 836-841, doi: 10.1126/science.7638601.
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., et al. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria, *Nature*, **337**, 620-625, doi: 10.1038/337620a0.
- Dickson, R., Weiss, C., Howard, R. J., Alldrick, S. P., Ellis, R. J., et al. (2000) Reconstitution of higher plant chloro-

- plast chaperonin 60 tetradecamers active in protein folding, *J. Biol. Chem.*, **275**, 11829-11835, doi: 10.1074/jbc.275.16.11829.
14. Ranson, N. A., White, H. E., and Saibil, H. R. (1998) Chaperonins, *Biochem. J.*, **333**, 233-242, doi: 10.1042/bj3330233.
 15. Mande, S. C., Mehra, V., Bloom, B. R., and Hol, W. G. (1996) Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*, *Science*, **271**, 203-207, doi: 10.1126/science.271.5246.203.
 16. Koumoto, R., Bonshtien, A. L., Mizrahi, I., Weiss, C., Niv, A., et al. (2003) On the oligomeric state of chloroplast chaperonin 10 and chaperonin 20, *Biochim. Biophys. Acta*, **1651**, 76-84, doi: 10.1016/S1570-9639(03)00237-1.
 18. Zhang, J., Ma, B., DiMaio, F., Douglas, N. R., Joachimiak, L. A., et al. (2011) Cryo-EM structure of a group II chaperonin in the prehydrolysis ATP-bound state leading to lid closure, *Structure*, **19**, 633-639, doi: 10.1016/j.str.2011.03.005.
 19. Zang, Y., Jin, M., Wang, H., Cui, Z., Kong, L., et al. (2016) Staggered ATP binding mechanism of eukaryotic chaperonin TRiC (CCT) revealed through high-resolution cryo-EM, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 1083-1091, doi: 10.1038/nsmb.3309.
 20. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., et al. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å, *Nature*, **371**, 578-586, doi: 10.1038/371578a0.
 21. Skjærven, L., Cuellar, J., Martinez, A., and Valpuesta, J. M. (2015) Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins, *FEBS Lett.*, **589**, 2522-2532, doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.019.
 22. Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Kaiser, A. D., and Wood, W. B. (1972) Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: effects of a bacterial mutation on T4 head assembly, *Nat. New Biol.*, **239**, 38-41, doi: 10.1038/newbio239038a0.
 23. Georgopoulos, C. P., and Hohn, B. (1978) Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the *groE* gene product), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 131-135, doi: 10.1073/pnas.75.1.131.
 24. Takano, T., and Kakefuda, T. (1972) Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid, *Nat. New Biol.*, **239**, 34-37, doi: 10.1038/newbio239034a0.
 25. Coppo, A., Manzi, A., Pulitzer, J. F., and Takahashi, H. (1973) Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **76**, 61-87, doi: 10.1016/0022-2836(73)90081-8.
 26. Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R., and Kaiser, A. D. (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly, *J. Mol. Biol.*, **76**, 45-60, doi: 10.1016/0022-2836(73)90080-6.
 27. Zweig, M., and Cummings, D. J. (1973) Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein, *J. Mol. Biol.*, **80**, 505-518, doi: 10.1016/0022-2836(73)90418-x.
 28. Hänninen, A. L., Bamford, D. H., and Bamford, J. K. (1997) Assembly of membrane-containing bacteriophage PRD1 is dependent on GroEL and GroES, *Virology*, **227**, 207-210, doi: 10.1006/viro.1996.8308.
 29. Grimaud, R., and Toussaint, A. (1998) Assembly of both the head and tail of bacteriophage Mu is blocked in *Escherichia coli groEL* and *groES* mutants, *J. Bacteriol.*, **180**, 1148-1153, doi: 10.1128/JB.180.5.1148-1153.1998.
 30. Van der Vies, S. M., Gatenby, A. A., and Georgopoulos, C. (1994) Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for *Escherichia coli* GroES in protein folding, *Nature*, **368**, 654-656, doi: 10.1038/368654a0.
 31. Ang, D., Richardson, A., Mayer, M. P., Keppel, F., Krisch, H., et al. (2001) Pseudo-T-even bacteriophage RB49 encodes CocO, a cochaperonin for GroEL, which can substitute for *Escherichia coli*'s GroES and bacteriophage T4's Gp31, *J. Biol. Chem.*, **276**, 8720-8726, doi: 10.1074/jbc.M008477200.
 32. Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., et al. (2005) Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages, *J. Mol. Biol.*, **354**, 536-545, doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.075.
 33. Kiljunen, S., Hakala, K., Pinta, E., Huttunen, S., Pluta, P., et al. (2005) Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine, *Microbiology*, **151**, 4093-4102, doi: 10.1099/mic.0.28265-0.
 34. Cornelissen, A., Hardies, S. C., Shaburova, O. V., Krylov, V. N., Mattheus, W., et al. (2012) Complete genome sequence of the giant virus OBP and comparative genome analysis of the diverse Φ KZ-related phages, *J. Virol.*, **86**, 1844-1852, doi: 10.1128/JVI.06330-11.
 35. Jang, H. B., Fagutao, F. F., Nho, S. W., Park, S. B., Cha, I. S., et al. (2013) Phylogenomic network and comparative genomics reveal a diverged member of the Φ KZ-related group, marine vibrio phage ϕ JM-2012, *J. Virol.*, **87**, 12866-12878, doi: 10.1128/JVI.02656-13.
 36. Lavysh, D., Sokolova, M., Minakhin, L., Yakunina, M., Artamonova, T., et al. (2016) The genome of AR9, a giant transducing Bacillus phage encoding two multisubunit RNA polymerases, *Virology*, **495**, 185-196, doi: 10.1016/j.virol.2016.04.030.
 37. Marine, R. L., Nasko, D. J., Wray, J., Polson, S. W., and Wommack, K. E. (2017) Novel chaperonins are prevalent in the viroplankton and demonstrate links to viral biology and ecology, *ISME J.*, **11**, 2479-2491, doi: 10.1038/ismej.2017.102.
 38. Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Sokolova, O. S., and Kurochkina, L. P. (2016) New GroEL-like chaperonin of bacteriophage OBP *Pseudomonas fluorescens* suppresses thermal protein aggregation in an ATP-dependent manner, *Biochem. J.*, **473**, 2383-2393, doi: 10.1042/BCJ20160367.
 39. Semenyuk, P. I., Moiseenko, A. V., Sokolova, O. S., Muronetz, V. I., and Kurochkina, L. P. (2020) Structural and functional diversity of novel and known bacteriophage-encoded chaperonins, *Int. J. Biol. Macromol.*, **157**, 544-552, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.189.
 40. Kurochkina, L. P., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Robben, J., Sykilinda, N. N., et al. (2012) Expression and functional characterization of the first bacteriophage-encoded chaperonin, *J. Virol.*, **86**, 10103-10111, doi: 10.1128/JVI.00940-12.
 41. Sun, Z., Scott, D. J., and Lund, P. A. (2003) Isolation and characterisation of mutants of GroEL that are fully functional as single rings, *J. Mol. Biol.*, **332**, 715-728, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00830-1.
 42. Illingworth, M., Ramsey, A., Zheng, Z., and Chen, L. (2011) Stimulating the substrate folding activity of a single ring GroEL variant by modulating the cochaperonin GroES, *J. Biol. Chem.*, **286**, 30401-30408, doi: 10.1074/jbc.M111.255935.
 43. Illingworth, M., Salisbury, J., Li, W., Lin, D., and Chen, L. (2015) Effective ATPase activity and moderate chaperonin-cochaperonin interaction are important for the functional single-ring chaperonin system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **466**, 15-20, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.034.

44. Viitanen, P. V., Lorimer, G. H., Seetharam, R., Gupta, R. S., Oppenheim, J., et al. (1992) Mammalian mitochondrial chaperonin 60 functions as a single toroidal ring, *J. Biol. Chem.*, **267**, 695-698.
45. Nielsen, K. L., and Cowan, N. J. (1998) A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding *in vivo*, *Mol. Cell*, **2**, 93-99, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80117-3.
46. Yan, X., Shi, Q., Bracher, A., Miličić, G., Singh, A. K., et al. (2018) GroEL ring separation and exchange in the chaperonin reaction, *Cell*, **172**, 605-617.e11, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.010.
47. Gomez-Llorente, Y., Jebara, F., Patra, M., Malik, R., Nisemblat, S., et al. (2020) Structural basis for active single and double ring complexes in human mitochondrial Hsp60-Hsp10 chaperonin, *Nat. Commun.*, **11**, 1916, doi: 10.1038/s41467-020-15698-8.
48. Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., et al. (1991) GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation, *Biochemistry*, **30**, 1586-1591.
49. Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., and Kurochkina, L. P. (2015) Effect of chaperonin encoded by gene 146 on thermal aggregation of lytic proteins of bacteriophage EL *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 172-179, doi: 10.1134/S0006297915020042.
50. Stanishneva-Konovalova, T. B., Semenyuk, P. I., Kurochkina, L. P., Pichkur, E. B., Vasilyev, A. L., et al. (2020) Cryo-EM reveals an asymmetry in a novel single-ring viral chaperonin, *J. Struct. Biol.*, **209**, 107439, doi: 10.1016/j.jsb.2019.107439.
51. Clare, D. K., Vasishtan, D., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G. W., et al. (2012) ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin, *Cell*, **149**, 113-123, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.047.
52. Horwich, A. L. (2011) Protein folding in the cell: An inside story, *Nat. Med.*, **17**, 1211-1216, doi: 10.1038/nm.2468.
53. Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex, *Nature*, **388**, 741-750, doi: 10.1038/41944.
54. Brocchieri, L., and Karlin, S. (2000) Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution, *Protein Sci.*, **9**, 476-486, doi: 10.1110/ps.9.3.476.
55. Fei, X., Yang, D., LaRonde-LeBlanc, N., and Lorimer, G. H. (2013) Crystal structure of a GroEL-ADP complex in the relaxed allosteric state at 2.7 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E2958-E2966, doi: 10.1073/pnas.1311996110.
56. Sokolova, O., Pichkur, E., and Kurochkina, L. (2020) Cryo-EM structure of the novel viral chaperonin, encoded by gene 228 of bacteriophage AR9 *Bacillus subtilis*, *Microsc. Microanal.*, **26**, 1286-1287, doi: 10.1017/S1431927620017584.
57. Maslova, E., Pichkur, E., Semenyuk, P., Kurochkina, L., and Sokolova, O. (2021) Abstract P-45: Structure of the bacteriophage AR9 *Bacillus subtilis* chaperonin according to cryo-electron microscopy, *Int. J. Biomed.*, **11**, S32, doi: 10.21103/IJBM.11.Suppl_1.P45.
58. Molugu, S. K., Hildenbrand, Z. L., Morgan, D. G., Sherman, M. B., He, L., et al. (2016) Ring separation highlights the protein-folding mechanism used by the phage EL-encoded chaperonin, *Structure*, **24**, 537-546, doi: 10.1016/j.str.2016.02.006.
59. Xu, Z., and Sigler, P. B. (1998) GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine, *J. Str. Biol.*, **124**, 129-141, doi: 10.1006/jsbi.1998.4060.
60. Bracher, A., Paul, S. S., Wang, H., Wischniewski, N., Hartl, F. U., et al. (2020) Structure and conformational cycle of a bacteriophage-encoded chaperonin, *PLoS One*, **15**, e0230090, doi: 10.1371/journal.pone.0230090.
61. Horwich, A. L., Apetri, A. C., and Fenton, W. A. (2009) The GroEL/GroES cis cavity as a passive anti-aggregation device, *FEBS Lett.*, **583**, 2654-2662, doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.049.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF VIRAL CHAPERONINS

Review

L. P. Kurochkina^{1*}, P. I. Semenyuk¹, and O. S. Sokolova²

¹ Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: lpk56@mail.ru

² Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Chaperonins provide a proper folding of proteins *in vivo* and *in vitro* and, as was thought until recently, are characteristic of prokaryotes, eukaryotes, and archaea. However, it turned out that some bacteria viruses (bacteriophages) encode their own chaperonins. This review presents the results of investigations of the first representatives of this new group chaperonins: the double-ring EL chaperonin and the single-ring OBP and AR9 chaperonins. A comparative analysis of the biochemical properties and structure of phage chaperonins with each other and with other known group I and group II chaperonins was carried out.

Keywords: chaperonin, bacteriophage, spatial structure, cryoelectron microscopy, crystallography

УДК 577.151.62

МУТАЦИИ В СУБЪЕДИНИЦЕ COX12 ДРОЖЖЕЙ СНИЖАЮТ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА IV

© 2022 S. Das, S. Mukherjee, M. Bedi, A. Ghosh*

Department of Biochemistry, University of Calcutta, 35 Ballygunge Circular Road,
Pin-700019, Kolkata, India; e-mail: alok.caluni@gmail.com

Поступила в редакцию 11.04.2021

После доработки 25.10.2021

Принята к публикации 21.11.2021

Цитохром *c*-оксидаза 6B1 (COX6B1) является одной из наименее изученных субъединиц комплекса IV (CIV) митохондриальной электрон-транспортной цепи. В настоящей работе мы изучали патобиохимические и респираторные функции Cox12 (дрожжевой ортолог COX6B1 человека) с использованием клеток *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*cox12Δ*), дефицитных по белку Cox12. Эти клетки показывали серьёзные затруднения в росте в аэробной (дыхательной) среде, содержащей глицерин и этанол, которые можно было восстановить путём комплементации с генами *COX12* дрожжей или *COX6B1* человека. Cox12 с остатком аргинина 17, замещённым гистидином (R17H) или цистеином (R17C) (мутации, аналогичные тем, которые наблюдаются у людей), не вызывал восполнение утраченной функции Cox12. Когда клетки *cox12Δ* выращивали в богатой дыхательной/ферментативной среде галактозы, изменений в экспрессии субъединиц дыхательной цепи не наблюдалось. Анализ с помощью метода голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле с последующим вестерн-блоттингом с использованием антител против Rip1 и Cox1, которые являются специфическими компонентами комплексов III (CIII) и IV (CIV) соответственно, не выявил заметного снижения содержания нативных суперкомплексов (SC) CIII₂CIV₂ и CIII₂CIV₁. Однако ассоциация фактора 2 респираторного суперкомплекса Rcf2 и субъединицы Cox2 с SC в клетках *cox12Δ* снижалась, а специфическая активность CIV снижалась на 90%. Как базальное дыхание, так и стимулированное сукцинатом/АДФ дыхание в состоянии 3, а также мембранный потенциал митохондрий в клетках *cox12Δ* были понижены. Кроме того, клетки *cox12Δ* и клетки, синтезирующие мутантные формы белка Cox12 (R17H и R17C), показывали большую чувствительность к окислительному стрессу, индуцированному H₂O₂, по сравнению с клетками дикого типа (WT). Моделирование *in silico* структуры SC дрожжей WT показало, что Cox12 формирует сеть взаимодействий с Rcf2 и Cox2. В целом полученные нами результаты говорят о том, что Cox12 необходим для проявления активности CIV.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *c*-оксидаза 6B1, Cox12, комплекс IV, суперкомплексы.

DOI: 10.31857/S0320972522010031

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром *c*-оксидаза (COX, EC 1.9.3.1) или комплекс IV (CIV) митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) переносит электроны от восстановленного ферроцитохрома *c* к молекулярному кислороду. Комплекс IV, который локализован на внутренней мембране митохондрий, является консервативным белковым комплексом, присутствующим у всех био-

логических видов — от одноклеточных пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* до человека. CIV млекопитающих состоит из 14 различных субъединиц [1, 2], 3 из которых кодируются митохондриальной ДНК: большие каталитические субъединицы COX1 и COX2, содержащие все окислительно-восстановительные центры, и субъединица COX3, которая участвует в формировании внутреннего ядра. Эти субъединицы собираются в холокомплекс CIV, образуя 3 модуля вместе с 11 меньшими субъединицами (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8A и NDUFA4), которые кодируются ядерной ДНК [3–7]. Биогенез CIV начинается с субъединицы COX1 (субкомплекс 1), к которой присоединяются COX4 и COX5A, в результате чего образуется субкомплекс 2. Затем модуль COX2 (COX2, COX5B, COX6C, COX7B, COX7C и COX8A) и модуль COX3 (COX3, COX6A, COX6B и COX7A) присоединяются к модулю COX1, в результате

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; BN-ПААГ — голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; СССР — карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон, разбавитель; COX — цитохром *c*-оксидаза; NAC — N-ацетилцистеин; OCR — скорость поглощения кислорода; R17H и R17C — мутантные формы гена *COX12HA*, кодирующие мутантные белки с заменами R17H или R17C; RFP — консервативный мотив Arg-Phe-Pro; SC — суперкомплекс; TMPD — N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамин; WT — дикий тип.

* Адресат для корреспонденции.

чего образуется субкомплекс 3 [8, 9]. Наконец, NDUFA4 присоединяется к субкомплексу 3, чтобы продуцировать холофермент CIV (рис. S1 в Приложении) [7].

Далее CIV может взаимодействовать с другими комплексами ЭТЦ с образованием суперкомплексов (SC). Например, CIV может объединяться с комплексом I (CI) и димерным комплексом III (CIII₂) с образованием суперкомплексов I + III₂ + IV₂ и I + III₂ + IV₁. Дрожжи лишены CI и образуют суперкомплексы III₂ + IV₁ и III₂ + IV₂ [10–12].

Кодируемая ядерным геном, субъединица COX6B встраивается в модуль COX3 на поздних этапах сборки CIV. COX6B содержит консервативный домен CHCH (coiled-coil helix coiled-coil helix) с редокс-активным и богатым остатками цистеина мотивом Sx₉Sx_nSx₁₀C, который способствует транслокации этого белка в митохондрии через пути Mia40-erv1 [13–16]. Другой консервативный мотив, Arg-Phe-Pro (RFP), располагается на N-концевом участке COX6B, но функция этого мотива пока неясна. Обнаружены две изоформы COX6B. COX6B1 присутствует практически во всех тканях за исключением опухолевых клеток семенников и поджелудочной железы, которые содержат COX6B2 [17].

COX6B1 является одной из шести субъединиц CIV. Мутации в этой субъединице были выявлены у пациентов с митохондриальными заболеваниями (MD). Мутации COX6B1 вызывают различные патофизиологические проявления, включая миопатию, тяжёлую детскую энцефаломиопатию, гидроцефалию и кардиомиопатию. Пациенты с такими мутациями часто умирают в раннем возрасте из-за отсутствия активности COX. Так, были идентифицированы 3 мутации COX6B: R20H, R20C и T81P. Интересно, что R20 является частью мотива RFP [18–20]. Дефекты CIV, вызванные мутациями в структурных субъединицах или факторах сборки, представляют собой второй по частоте тип наследственных MD после дефектов CI [21–24]. Кроме того, значение COX6B1 подчёркивается тем фактом, что сверхэкспрессия COX6B1 оказывает защитное действие при вызванном ишемией/реперфузией (I/R) повреждении нейронов и окислительном стрессе, опосредованном активными формами кислорода (АФК) в кардиомиоцитах крысы [25]. Активная регуляция COX6B1 и повышенная доля высокомолекулярных SC наблюдалась в печени животных, подвергшихся ограничению калорийности. В то же время сверхэкспрессия COX6B1 в культуре клеток 3T3 способствовала выживанию этих клеток, что позволяет предположить, что COX6B1

вносит вклад в антивозрастные эффекты ограничения калорийности [14].

Основные сведения о биохимической роли COX6B1 были получены при изучении дрожжей *S. cerevisiae*. Клетки дрожжей — удобный объект для проведения генетических манипуляций. Кроме того, дрожжи с дефектной дыхательной цепью могут расти на ферментативных источниках углерода. Белок COX6B1 человека и его дрожжевой ортолог Cox12 демонстрируют идентичность последовательностей более чем на 42%. Делеция Cox12 ассоциируется со снижением содержания цитохрома *a*+*a*₃. В результате эти клетки не могут расти в аэробной дыхательной среде [26]. Ранее мы продемонстрировали, что функции Coa6 — фактора сборки CIV, который также содержит мотив Sx₉Sx_nSx₁₀C, перекрываются с функциями Cox12 дрожжей [27, 28]. Клетки *coa6Δ* и *cox12Δ* не показывали ограниченный рост в аэробной/ферментационной среде, содержащей галактозу, при 30 °C. Клетки *coa6Δ cox12Δ* (с двойным нокаутом) не могли расти в тех же условиях из-за отсутствия субъединицы Cox2, и этот фенотип не мог быть спасён при добавлении в среду экзогенной меди (в отличие от клеток *coa6Δ*) [27]. Было показано, что Cox12 присоединяется к модулю Cox3 на поздних стадиях сборки комплекса, а фактор 2 (Rcf2) дыхательного SC обеспечивает встраивание и стабильность Cox12 во время сборки модуля Cox3 [29–31]. Модули Cox1 и Cox2, которые содержат весь каталитический гем *a*+*a*₃ и центры меди, собираются до присоединения Cox12 к комплексу IV. До сих пор остаётся неясным, как мутации в Cox12 изменяют дыхательную активность и процесс сборки CIV. В настоящей работе мы использовали клетки *S. cerevisiae cox12Δ*, чтобы изучить биохимическую и физиологическую роль Cox12 в биогенезе и активности CIV.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей, культивирование клеток и плазмиды. Клетки *S. cerevisiae* дикого типа (WT) BY4741 (*Mat-a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*; лабораторные штаммы, полученные из штамма S288C) и клетки *cox12Δ* (*Mat-a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR038C::kanMX4*) («Invitrogen», США) культивировали и поддерживали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% декстрозы) при 30 °C. Делеция гена *cox12Δ* была подтверждена проведением ПЦР колонии клеток (табл. S1 в Приложении); *coa6Δ*, *sco1Δ* и клетки *pet117Δ* с известными дефектами CIV («Invitrogen») были использованы

в качестве отрицательных контролей [28]. Для проверки восстановления роста клеток в среду YPD и YPGE добавляли 25 мМ N-ацетилцистеин (NAC).

Клетки дрожжей культивировали в среде YPD, затем их инокулировали в среду YPD, YPGal (2% галактозы) или YPGE (3% глицерина + 1% этанола). Чашки со средами YPD, YPGal и YPGE были приготовлены с добавлением 2% агара. Для проведения измерений роста клеток на чашки со средами YPD, YPGal или YPGE наносили последовательные десятикратные разведения ночных культур, и их инкубировали при 30 °С и 37 °С в течение определенных периодов времени. Рост дрожжей в жидкой среде измеряли спектрофотометрически при 600 нм. Плазмиду pRS416 с низким числом копий («Addgene», США) использовали для клонирования гена *COX6B1* человека, дрожжевого *COX12* и гена *COX12*, меченного C-концевым гемагглютинином (НА), под контролем промотора *GPD* с использованием специфических праймеров (табл. 1). Конструкцию дрожжевого *COX12HA* использовали в качестве матрицы для проведения сайт-направленного мутагенеза («Agilent Technologies QuikChange Lightning», США) для создания точечных мутантов R17C и R17H с использованием праймеров, указанных в табл. 1.

Все конструкции были подтверждены секвенированием ДНК. Дрожжевые клетки, трансформированные с помощью плазмиды pRS416-GPD, культивировали в средах без урацила (-URA): SCD (2% декстрозы) и SCGE (3% глицерина + 1% этанола).

Получение митохондриальной и цитозольной фракций. Клетки дрожжей (1 г), выращенные до достижения поздней лаг-фазы, использовали для получения митохондриальной и цитозольной фракций. Митохондрии выделяли, как

описано ранее [32]. Для приготовления цитозольной фракции дрожжевые клетки обрабатывали Zymolyase 20T («US Biological», США) и гомогенизировали во льду в буфере, содержащем 0,6 М сорбитол, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ PMSF. Обломки клеток удаляли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин при 4 °С. Супернатант осветляли с помощью ультрацентрифугирования при 150 000 g в течение 1 ч при 4 °С. К митохондриальной и цитозольной фракциям добавляли смесь ингибиторов протеаз («Roche cOmplete», Германия), и полученные препараты хранили при -80 °С. Концентрацию белка определяли с помощью наборов BCA assay kit («Thermo Scientific», США).

SDS-ПААГ, голубой нативный ПААГ и иммуноблоттинг. Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) и голубой нативный ПААГ (BN-ПААГ) проводили для разделения денатурированных и нативных белковых комплексов соответственно [33]. Для SDS-ПААГ лизаты митохондрий (5–10 мкг) разделяли в 15%-ном Tris-глициновом геле. Для BN-ПААГ 20 мкг митохондриальных белков солибилизировали в буфере, содержащем 50 мМ имидазол (pH 7,2), 500 мМ 6-аминогексановую кислоту, 1 мМ ЭДТА, 1× cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail («Roche») и 2% дигитонина, в течение 20 мин при 4 °С и центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин при 4 °С. Перед нанесением белков на нативный 3–13% Bis-Tris градиентный гель в супернатант добавляли краситель Кумасси голубой G-250 (0,01%). Для проведения иммуноокрашивания разделённые белки переносили на PVDF-мембрану и зондировали следующими антителами: анти-Cox1 (1 : 1000; «Abcam», Великобритания); анти-Cox2 (1 : 10 000; «Abcam»); анти-Cox3 (1 : 5000; «Abcam»); анти-Cox4 (1 : 1500; «Abcam»); анти-

Таблица 1. Праймеры, использованные в данной работе

Праймер	Последовательность (5'→3')
pRS416-GPD- <i>COX12</i> прямой (EcoRI)	TAC CCG GAATTC CGG ATG GCT GAT CAA GAA AAC TCT CCA CT
pRS416-GPD- <i>COX12HA</i> обратный (XhoI)	AGA CCG CTCGAG CGG TTA CGC ATA GTC AGG AAC ATC GTA TG
pRS416-GPD- <i>COX6B1</i> прямой (EcoRI)	CTG CCG GAATTC CGG ATG GCG GAA GAC ATG GAG ACC AAA AT
pRS416-GPD- <i>COX6B1</i> обратный (XhoI)	AGA CCG CTCGAG CGG TTA TCA GAT CTT CCC GGG AAA CGT
Cox12 R20H прямой	ACA GTT GGT TTC GAT GCT CAC TTT CCC CAA AAC CAA
Cox12 R20H обратный	TTG GTT TTG GGG AAA GTG AGC ATC GAA ACC AAC TGT
Cox12 R20C прямой	ACA GTT GGT TTC GAT GCT TGC TTT CCC CAA AAC CAA
Cox12 R20C обратный	TTG GTT TTG GGG AAA GCA AGC ATC GAA ACC AAC TGT

Cox12 (1 : 1500; любезно предоставлены сотрудниками лаборатории доктора С. Мейсингера); анти-Coa6 (1 : 1500) и анти-Rip1 (1 : 300 000) (любезно предоставлены сотрудниками лаборатории доктора В. Зара); анти-Rcf1 (1 : 1000) и анти-Rcf2 (1 : 1500) (любезно предоставлены сотрудниками лаборатории доктора М. Отта); анти-Vdac1 (1 : 10 000; «Abcam») и анти-Pgk1 (1 : 5000; «Abcam»). Мембраны инкубировали со вторичными антителами в разведении 1 : 5000 в течение 1 ч при комнатной температуре и производили окрашивание с использованием реагентов Clarity Western-ECL («Bio-Rad», США) или Super Signal West Femto («Thermo Scientific»). Все изображения гелей были получены с помощью системы «Bio-Rad Chemidoc», США.

Определение активности в геле. Нативные белковые комплексы разделяли с помощью чистого нативного электрофореза в ПААГ (CN-ПААГ), после чего проводили определение активности в геле комплекса V (CV) и объединённой активности CIII + CIV [33]. Белки мембраны митохондрий получали, как было описано выше перед проведением BN-ПААГ. После центрифугирования при 20 000 *g* в течение 30 мин при 4 °С собирали прозрачный супернатант, и перед нанесением на 3–13%-ный нативный Bis-Tris градиентный гель в него добавляли 10% глицерина. Для определения активности CIII + CIV гель окрашивали 25 мМ диаминобензидином (DAB), растворённым в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,2), в течение 1 ч. Далее добавляли 60 мкМ цитохрома *c* из сердца лошади и инкубировали ещё 30 мин до появления полос, окрашенных в коричневый цвет. Реакцию останавливали добавлением 50% метанола, содержащего 10% уксусной кислоты.

Для измерения АТФ-гидролизующей активности CV гель предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч в буфере, содержащем 35 мМ Tris-HCl (pH 8,3) и 270 мМ глицин. Затем гель переносили в буфер, содержащий 35 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 270 мМ глицин, 14 мМ MgSO₄, 0,2% Pb(NO₃)₂ и 8 мМ АТФ, ещё на 1 ч. АТФ-гидролизующую активность определяли по появлению белого осадка фосфата свинца. Реакцию останавливали добавлением 50% метанола на 30 мин. Все изображения гелей получали с помощью системы «Bio-Rad Chemidoc».

Спектрофотометрическое определение активности комплекса IV. Активность CIV оценивали спектрофотометрически, отслеживая использование восстановленного цитохрома *c* при 550 нм [34]. Реакционная смесь (1 мл) содержала 50 мМ фосфата калия (pH 7,5) и 50 мкМ восстановленного цитохрома *c*. Реакцию запускали добавле-

нием 2–3 мкг митопластов и проводили в течение 5 мин. Чтобы рассчитать действительную активность CIV, из полученных данных вычитали скорость этой реакции в присутствии 100 мкМ азида натрия.

Скорость поглощения кислорода. Чтобы измерить дыхательную активность на уровне клетки, дрожжевые клетки выращивали в среде YPGal, собирали на поздней лаг-фазе ($A_{600} = 8$) и ресуспендировали в свежей среде YPGal при концентрации 10⁸ клеток/мл. Базальную скорость потребления кислорода (OCR) измеряли при 30 °С с помощью прибора Oxytherm («Hansatech», Великобритания), снабжённого электродом Кларка. Клетки, трансформированные пустым вектором pRS416-GPD или плазмидами, несущими гены *COX12HA*, *R17H* или *R17C* (*R17H* и *R17C* – мутантные формы гена *COX12HA*, кодирующие мутантные белки с заменами R17H или R17C), культивировали в среде SCD (-URA) до $A_{600} = 8$ и ресуспендировали в свежей среде при концентрации 10⁸ клеток/мл, чтобы определить базальное значение OCR при 30 °С. Дыхание блокировали через 4 мин измерений добавлением 1 мМ азида натрия (специфический ингибитор CIV). Среднее значение OCR (нмоль кислорода/мин на 10⁸ клеток) оценивали по данным как минимум трёх независимых экспериментов. Исходный уровень и значения неспецифической OCR (после добавления азида натрия) были незначительными.

Чтобы измерить уровень митохондриального дыхания, свежесыведенные митохондрии ресуспендировали в 1 мл дыхательной среды, содержащей 0,6 М маннитол, 2 мМ MgCl₂, 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,2), 1 мМ ЭДТА и 10 мМ K₂HPO₄. Для индукции дыхания использовали различные субстраты, специфичные к отдельным комплексам, такие как 10 мМ динатриевой соли янтарной кислоты (CII) или 12,5 мМ аскорбиновой кислоты + 1,4 мМ N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамин (TMPD) (CIV). Для индукции дыхательного состояния 3 добавляли АДФ (200 мкМ). Для блокировки митохондриального дыхания через 4 мин добавляли 1 мМ азида натрия. Максимальное значение дыхательной ёмкости определяли путём добавления 5 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (СССР, разобщитель) в присутствии 10 мМ динатрий-сукцината + 200 мкМ АДФ (см. типичный график скорости для последовательности различных добавок на рисунках). В каждой серии определений концентрация митохондриального белка составляла 250–350 мкг/мл. Среднее значение OCR (нмоль кислорода/мин на мг митохондриального белка) оценивалось по данным как минимум трёх независимых экс-

периментов. Исходный уровень и значения неспецифической OCR были незначительными.

Анализ чувствительности клеток к окислительному стрессу. Клетки WT и *cox12Δ* выращивали до значения $A_{600} = 3$ в среде, содержащей 2%-ную декстрозу, при 30 °C, и затем их обрабатывали 2,5 мМ перекисью водорода в течение 30 мин или использовали сразу. Приготовленные серии разведений клеточных культур в стерильной воде высевали в чашки с YPD. Снимки делали через каждые 2 дня. Клетки WT и *cox12Δ*, трансформированные плазмидой pRS416-GPD, содержащей гены *COX12HA*, *R17H* или *R17C*, выращивали в среде SCD (-URA) при 30 °C до $A_{600} = 3$, а затем обрабатывали 2,5 мМ перекисью водорода в течение 30 мин или же использовали сразу. Десятикратные серийные разведения клеток наносили на чашки со средой SCD (-URA), и клетки выращивали при 30 °C [35].

Определение мембранного потенциала митохондрий. Дрожжевые клетки выращивали в среде YPD до $A_{600} = 3$ и затем инкубировали с 10 мкМ CCCP или без него в течение 30 мин при 30 °C. Далее клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Полученные осадки ресуспендировали в 500 мкл фосфатного солевого буфера (PBS) и трижды промывали в течение 5 мин при комнатной температуре. К 500 мкл клеточной суспензии в PBS добавляли специфичный к мембранам митохондрий флуоресцентный краситель DiOC₆ («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 20 нг/мл и инкубировали в течение 30 мин в темноте. Чтобы удалить избыток красителя, клетки осаждали и промывали 3 раза PBS. Клетки изучали с помощью флуоресцентной микроскопии («Olympus», Япония): возбуждение при 485 нм и эмиссия при 520 нм. Изображения анализировали с помощью программ FLUO VIEW («Olympus») и ImageJ («NIH»).

Изучение белок-белковых взаимодействий с помощью программы PyMOL. *In silico* моделирование проводили с использованием недавно опубликованных структур дрожжевых суперкомплексов III₂IV₂ и III₂IV₁, полученных с помощью крио-ЭМ (PDB IDs: 6T0B и 6T15) [29]. Ионные взаимодействия Cox12 с другими субъединицами CIV были проанализированы с помощью программы PyMOL.

Статистическая обработка данных. Полученные результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку данных (*t*-критерий Стьюдента) проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,001$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Cox12/COX6B1 необходим для роста дрожжей в аэробной среде. Выравнивание аминокислотной последовательности белков COX6B человека, крысы, рыбок Данио, мух и дрожжей с использованием программы ClustalW показало, что COX6B является эволюционно консервативным белком. Cox12 дрожжей имеет более чем 42 и 37% идентичности последовательности с изоформами COX6B1 и COX6B2 соответственно (рис. 1, а).

Для определения биологической роли субъединицы COX6B1 в сборке митохондриального дыхательного комплекса мы использовали дрожжевые клетки WT и *cox12Δ* *S. cerevisiae*. Мы регистрировали рост этих клеток на различных источниках углерода при различных температурах, чтобы оценить эффективность их дыхания. Оба типа клеток выращивали в течение 2–3 дней в богатой ферментационной среде YPD, содержащей декстрозу, и в дыхательной среде YPGE, содержащей глицерин и этанол. Рост клеток WT и *cox12Δ* в среде YPD был сопоставим до 10 ч. После этого скорость роста клеток *cox12Δ* снижалась без перехода в двухфазный рост, что свидетельствует об отсутствии способности использовать этанол (конечный продукт ферментации), поскольку такая способность требует активную митохондриальную ЭТЦ (рис. 1, б). Как и ожидалось, клетки *cox12Δ* не росли в среде YPGE, что подтвердило наличие дефекта в дыхательной системе этих клеток (рис. 1, в). Мы также проанализировали рост клеток WT и *cox12Δ* на твердых средах YPD, YPGE и YPGal (т.е. средах с различными источниками углерода) при различных температурах. В качестве отрицательного контроля были использованы дрожжевые клетки с известными дефектами CIV (*coa6Δ*, *sco1Δ* и *pet117Δ*) (рис. 1, д) [28]. Как ожидалось, рост клеток *cox12Δ* на твердых средах YPD и YPGal был почти такой же, как рост клеток дикого типа, но был сильно понижен при культивировании в среде YPGE как при 30 °C, так и при 37 °C (рис. 1, д).

Далее мы трансформировали клетки *cox12Δ* генами *COX12HA* или *COX6B1* человека, клонированными в низкокопийную плазмиду pRS416 под контролем промотора *GPD* и определили способность этих генов восполнить недостаток респираторного роста в дыхательной среде SCGE с глицерином/этанолом. Оба гена, *COX12HA* и *COX6B1*, способствовали восстановлению дыхательного фенотипа клеток *cox12Δ* (рис. 1, е). Ген *COX12* дикого типа без гемагглютининового тэга также восстанавливал дыха-

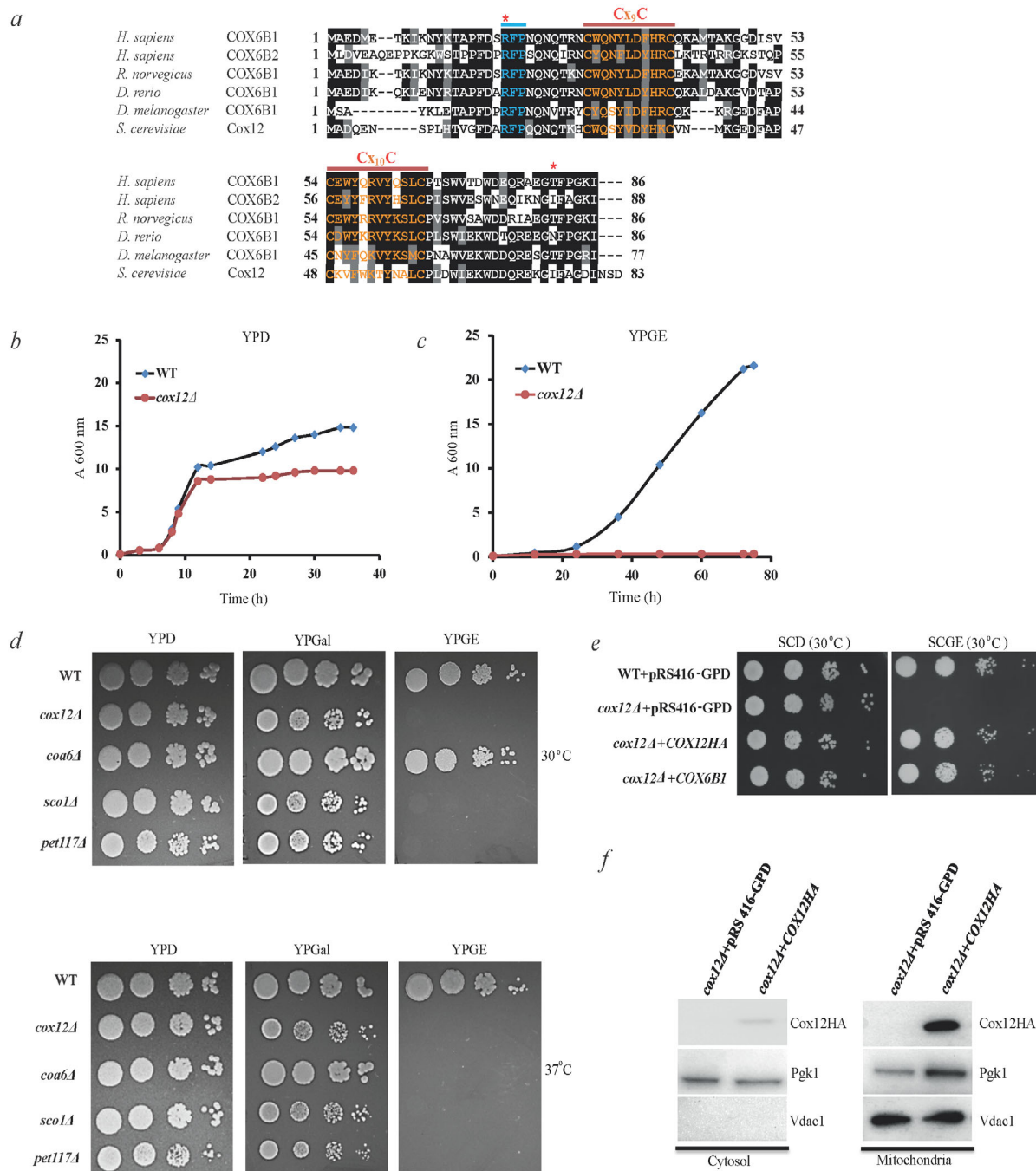


Рис. 1. Клетки *cox12Δ* дрожжей показывают сниженный рост на аэробной дыхательной среде. **a** – Выравнивание последовательностей белка COX6B из различных видов (в клетках человека имеются 2 изоформы: COX6B1 и COX6B2). Горизонтальными линиями над последовательностью отмечены консервативные мотивы Cx_9 , Cx_n , Cx_{10} и RFP. Звездочками показаны аминокислотные остатки, подвергающиеся мутациям у людей. **b–c** – При проведении анализа кривой роста клетки WT и *cox12Δ* культивировали в бульоне YPD, а затем инокулировали в свежей среде YPD (**b**) или YPGE (**c**) до $A_{600} = 1$. Рост клеток регистрировали через указанные интервалы времени при 30 °C. **d** – Серийные десятикратные разведения клеток WT и *cox12Δ*, выращенных в течение ночи в среде YPD, наносили на чашки с YPD, YPGal и YPGE и инкубировали при 30 или 37 °C. Снимки были сделаны через 2–5 дней роста. В качестве отрицательного контроля использовали клетки с известными дефектами CIV (*coa6Δ*, *sco1Δ* и *pet117Δ*). **e** – Клетки WT и *cox12Δ*, трансформированные пустым вектором (pRS416-GPD) или векторами, экспрессирующими дрожжевой белок Cox12HA или COX6B1 человека, наносили на чашки со средами без урацила (-URA) – SCD и SCGE – и выращивали при 30 °C. Снимки были сделаны через 2–5 дней роста. **f** – SDS-ПААГ и вестерн-блот-анализ уровней белка Cox12HA в митохондриальной и цитозольной фракциях клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором или геном COX12HA. Vdac1 и Pgk1 были использованы в качестве контроля нагрузки митохондриальной и цитозольной фракций соответственно. Все результаты блоттинга представляют по крайней мере 3 независимых эксперимента

тельный фенотип в клетках *cox12Δ* (данные не показаны). Внутриклеточная локализация белка Cox12 была установлена с помощью метода SDS-ПААГ и последующего иммуноблоттинга цитозольной и митохондриальной фракций лизата клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором или *COX12HA*. Как ожидалось, белок Cox12HA экспрессировался и локализовался в митохондриях (рис. 1, *f*). Следовательно, COX6B1 человека и Cox12 являются ортологами, и каждый из этих двух белков может восстанавливать дефект роста в аэробной среде клеток *cox12Δ*.

Делеция Cox12 вызывает снижение активности CIV. Чтобы выяснить биохимическую основу пониженного респираторного роста клеток *cox12Δ*, нами была изучена стационарная экспрессия субъединиц ЭТЦ в митохондриальных экстрактах клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*, растущих в аэробной/ферментационной среде YPGal. SDS-ПААГ и последующий вестерн-блоттинг не выявили значительных различий в содержании свободных CIII-специфичных (Rip1) и CIV-специфичных (Cox1–4) субъединиц и факторов сборки SC (Rcf1 и Rcf2) в митохондриях *cox12Δ* по сравнению с митохондриями клеток WT и *coa6Δ* (рис. 2, *a*).

Был проведён BN-ПААГ/вестерн-блоттинг митохондрий, солюбилизированных 2%-ным дигитонином, чтобы выявить в образцах митохондрий нативные суперкомплексы. Интересно, что аналогично данным, полученным для стационарной экспрессии белка, наблюдалось только частичное снижение количества SC III₂IV₂ и III₂IV₁, когда использовались антитела против Cox1 и Rip1 (рис. 2, *b*). Это не удивительно, поскольку CIII₂ может образовывать SC до того момента, когда будет полностью сформирован CIV [29]. Однако встраивание Rcf2 и Cox2 в SC в клетках *cox12Δ* было в значительной степени снижено, в то время как возрастала ассоциация Rcf1 с SC (рис. 2, *b*) (см. раздел «Обсуждение»). Далее мы провели CN-ПААГ с последующим анализом активности в геле экстрактов митохондрий, солюбилизированных дигитонином. В клетках *cox12Δ* было обнаружено значительное снижение активности C(III + IV) по сравнению с клетками WT, в то время как объединённая активность CV ($V_1 + V_2$) оставалась без изменений (рис. 2, *c*).

Мы также измерили специфическую активность CIV в образцах митохондрий из клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*. Удельная активность CIV в митохондриях из клеток WT была равна 148 нмоль/мин на мг белка. Лишь 18% этой активности было обнаружено в митохондриях из клеток *cox12Δ* (рис. 2, *d*). В целом эти данные

подтверждают то, что хотя Cox12 может быть незаменим для частичного биогенеза CIV, его делеция делает CIV неактивным.

OCR и максимальная дыхательная ёмкость серьёзно нарушены в клетках *cox12Δ*. Чтобы оценить физиологическое влияние пониженной активности CIV в клетках *cox12Δ*, мы измерили OCR целых клеток и митохондрий с использованием электрода Кларка для полярографического определения содержания O₂. Как и ожидалось, клетки дефицитные по гену *COX12*, показывали значительное снижение (90%) базального уровня клеточной OCR по сравнению с клетками WT, тогда как контрольные клетки *coa6Δ* показывали снижение уровня OCR на 45% (рис. 3, *a*).

Затем измеряли OCR в стимулированном сукцинатом/ADP состоянии 3. Митохондрии из клеток *cox12Δ* показали снижение OCR более чем на 80% по сравнению с клетками WT (рис. 3, *b*). Мы также измерили CIV-опосредованную OCR в присутствии высоких миллимольных концентраций аскорбата и TMPD (искусственные субстраты дыхания). Удивительно, но в клетках *cox12Δ* было обнаружено только 29%-ное снижение управляемой CIV OCR, что позволяет предположить, что есть некоторое восполнение OCR по сравнению с сукцинат-опосредованным дыханием (рис. 3, *c*; см. раздел «Обсуждение»). В присутствии 5 мкМ СССР значение максимальной дыхательной ёмкости митохондрий снижалось на 45% по сравнению с клетками WT (рис. 3, *d*). Запасная дыхательная ёмкость (разница между OCR в состоянии 3 и максимальной OCR) была также значительно снижена в клетках *cox12Δ* (данные не показаны). Следовательно, отсутствие правильной сборки CIV в клетках *cox12Δ* может серьёзно нарушить поток электронов через ETC.

Подавление мембранного потенциала митохондрий в клетках *cox12Δ*. Мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) является основной силой в митохондриях, которая способствует переносу протонов через комплекс V, в результате чего образуется АТФ. Чтобы выяснить, влияет ли снижение дыхания и дефекты ЭТЦ клеток *cox12Δ* на величину $\Delta\psi_m$, мы измерили $\Delta\psi_m$ в клетках WT и *cox12Δ*, используя цианин-содержащий флуоресцентный краситель DiOC₆, который на протяжении долгого времени применяется для определения митохондриального $\Delta\psi_m$.

Наши результаты показали, что отсутствие Cox12 изменяет нормальное формирование потенциала митохондриальной мембраны. Добавление 10 мкМ СССР рассеивало $\Delta\psi_m$ как в клетках WT, так и в клетках *cox12Δ* (рис. 4, *a*). Совместное ингибирование дыхания и $\Delta\psi_m$ может также

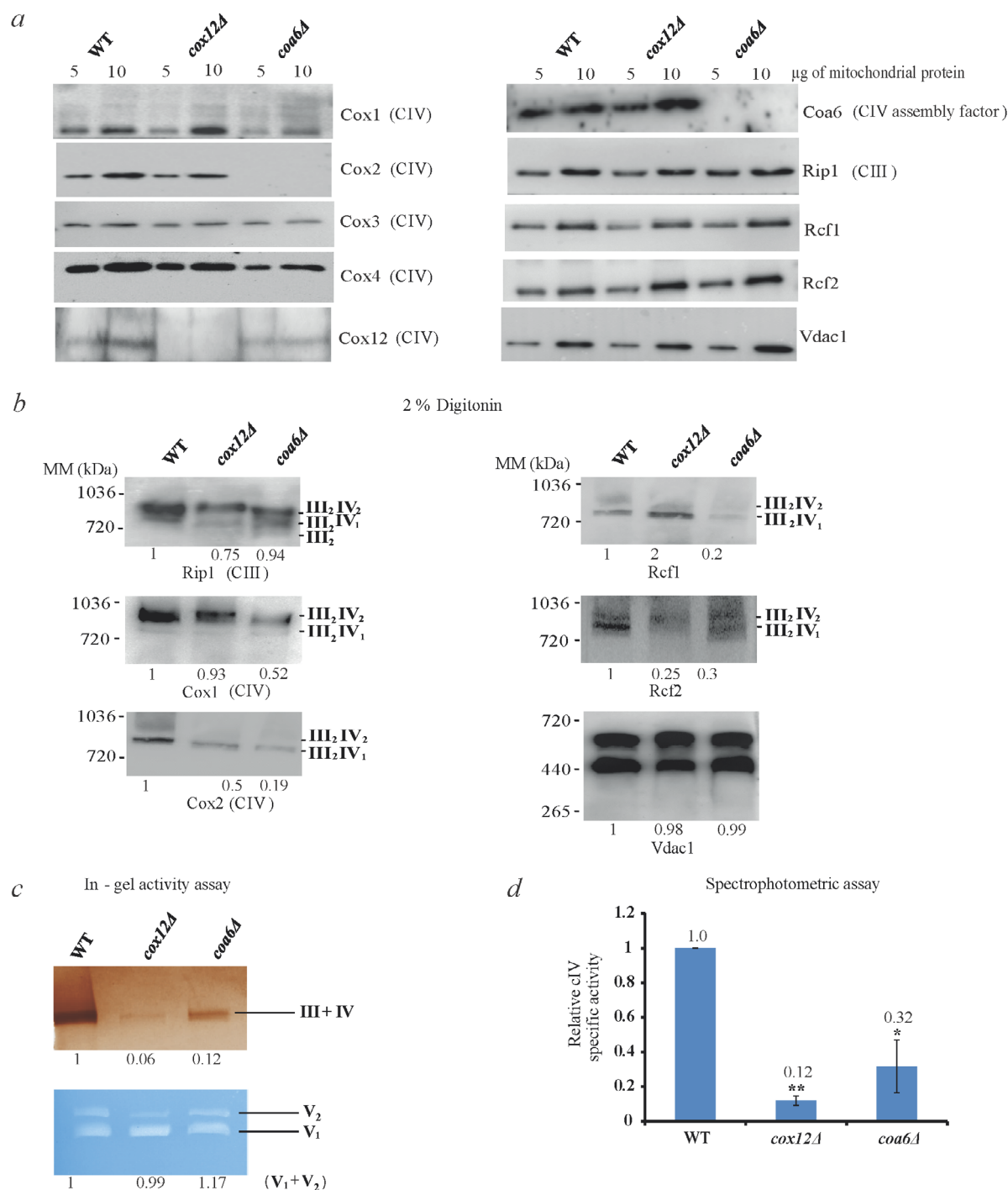


Рис. 2. Делеция *Cox12* понижает активность CIV. **a** – SDS-ПААГ/иммуноблоттинг митохондриальных лизатов из клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*, выращенных в среде YPGal до $A_{600} = 8$. Далее 5–10 мкг белка митохондрий подвергались разделению в 15%-ном Tris-глициновом геле с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против CIII (Rip1), CIV (Cox1–4 и Cox12), специфических субъединиц и факторов сборки (Coa6, Rcf1 и Rcf2). Vdac1 был использован в качестве контроля нагрузки. **b** – BN-ПААГ/иммуноблоттинг образцов митохондрий (20 мкг белка), солюбилизованных 2%-ным дигитонином и разделённых в 3–13%-ном градиентном Bis-Tris-геле с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против CIII, CIV и факторов сборки SC (Rcf1 и Rcf2). Vdac1 был использован в качестве контроля нагрузки (денситометрически определённые комбинированные интенсивности полос для всех SC показаны под отдельными полосами). **c** – Окрашивание в геле активности C(III + IV)- и CV-содержащих SC в образцах митохондрий, солюбилизованных 2%-ным дигитонином, из клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*. **d** – CIV-специфичная активность в вышеупомянутых образцах митохондрий, измеренная спектрофотометрически при 550 нм. Полученные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка, $n = 3$ или более, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Все представленные результаты блоттинга были получены при проведении по крайней мере трёх независимых экспериментов

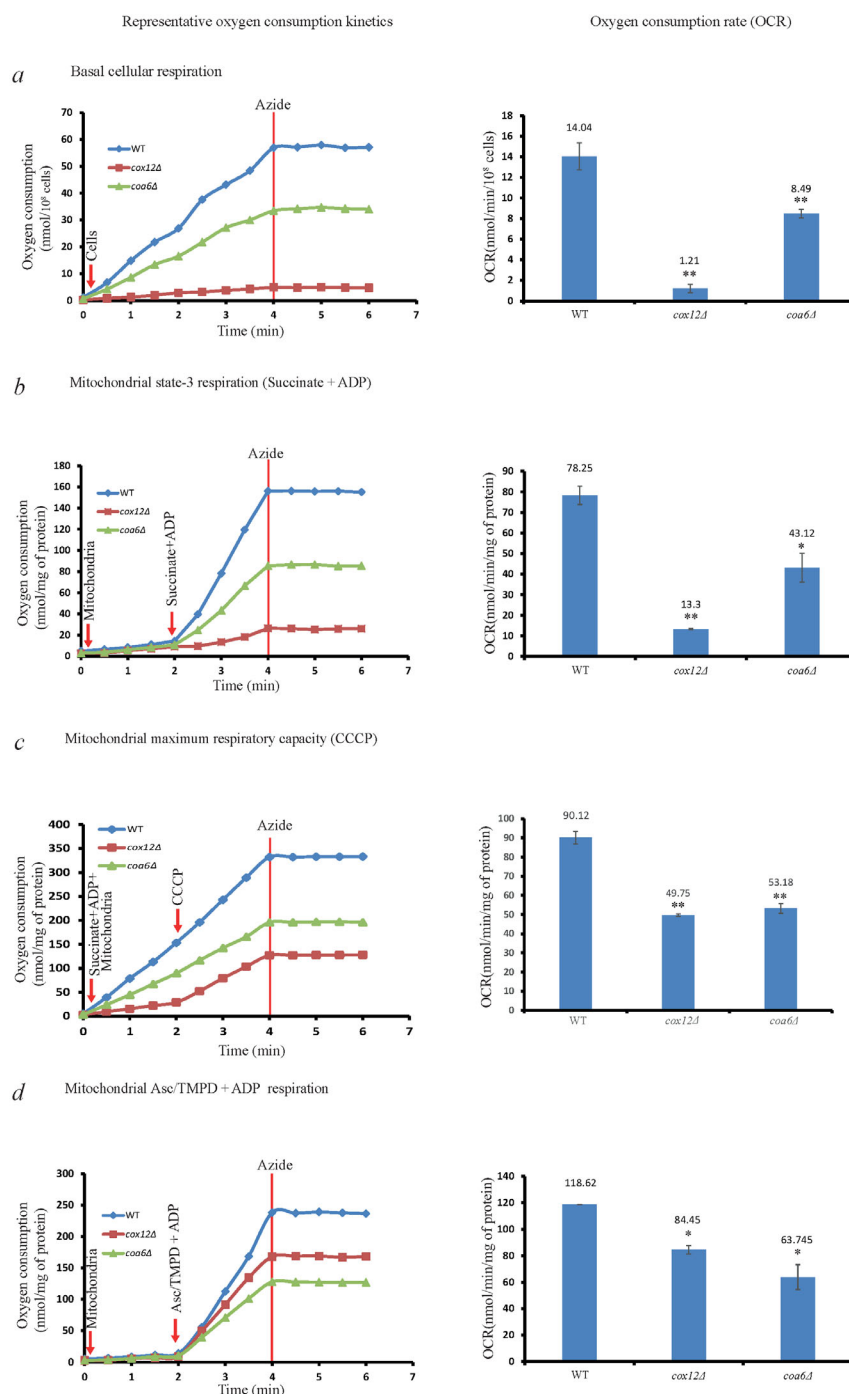


Рис. 3. Митохондриальное дыхание в клетках *cox12Δ* серьёзно нарушено. Левая часть рисунка — репрезентативная кинетика потребления кислорода. Правая часть рисунка — значения OCR, рассчитанные на основании по крайней мере трёх независимых экспериментов. Средние значения OCR определяли от 2 до 4 мин после добавления субстрата. *a* — Эндогенное дыхание клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*, измеренное при концентрации 10^8 клеток/мл, в среде YPGal при 30 °C с использованием электрода для определения O_2 . Через 4 мин для блокировки дыхания добавляли азид натрия (1 мМ) (вертикальная линия). *b* — Кинетика потребления кислорода и OCR свежеевыделенных митохондрий, измеренная в 1 мл респираторного буфера, содержащего 0,6 М маннитол, 2 мМ $MgCl_2$, 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,2), 1 мМ ЭДТА и 10 мМ K_2HPO_4 . Уровень дыхания определяли в присутствии 10 мМ сукцината + 200 мкМ АДФ. *c* — Максимальную дыхательную ёмкость митохондрий измеряли при добавлении 5 мкМ CCCP в присутствии 10 мМ сукцината + 200 мкМ АДФ при 30 °C. *d* — Уровень дыхания, измеренный с использованием 1,4 мМ TMPD/12,5 мМ аскорбата + 200 мкМ АДФ, при 30 °C при постоянном перемешивании. Во всех экспериментах стрелками показаны добавки, а вертикальные линии представляют добавку азид натрия. Числа над отдельными столбиками показывают среднее значение OCR. Все результаты были получены с помощью прибора Oxytherm, снабжённого электродом Кларка («Hansatech»). Значения OCR представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка, $n \geq 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

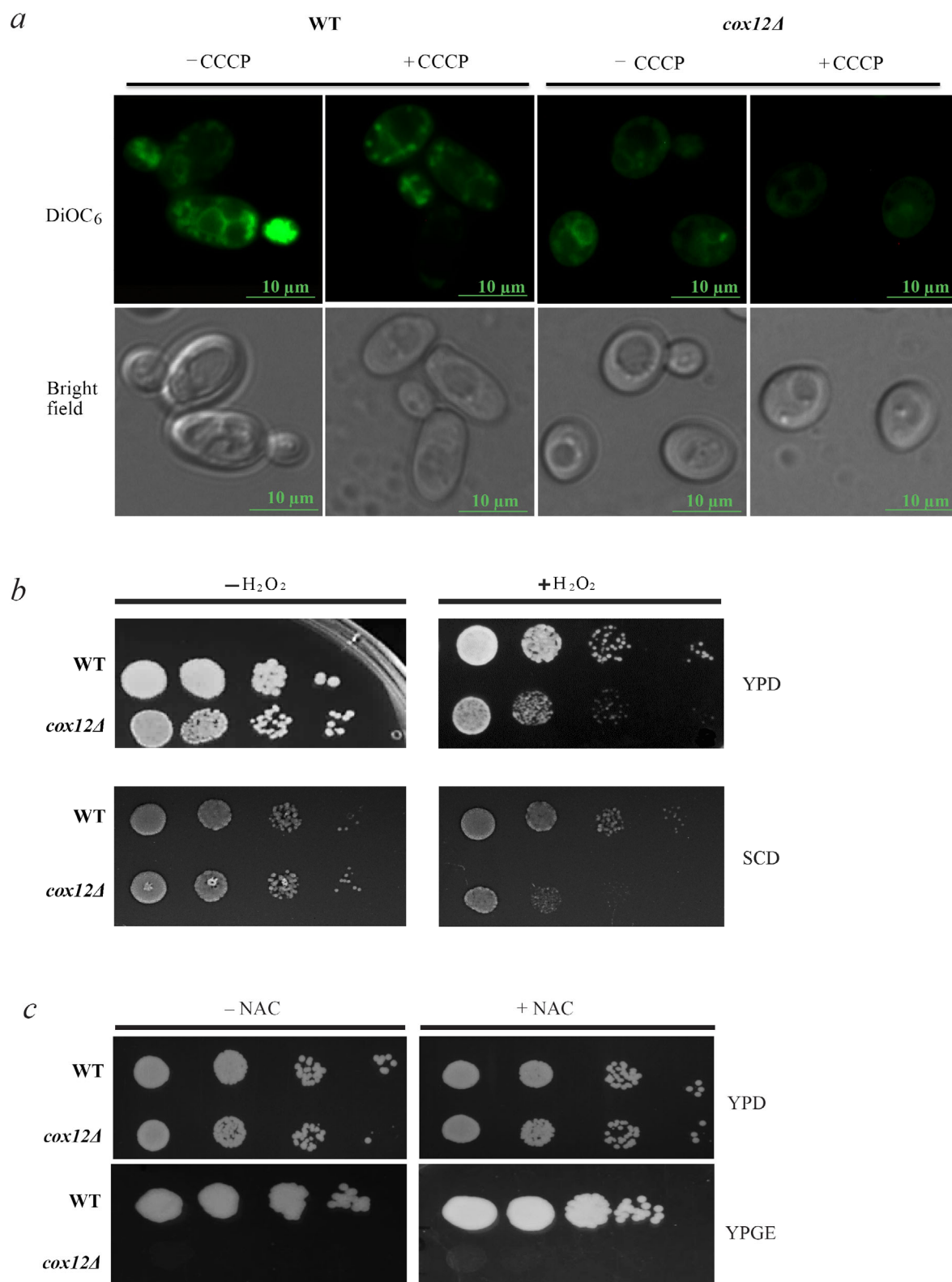


Рис. 4. Мембранный потенциал митохондрий в клетках *cox12Δ* был понижен. **a** – Клетки WT и *cox12Δ*, окрашенные специфическим для мембранного потенциала митохондрий красителем DiOC₆ (20 нг/мл). Флуоресцентные микрофотографии и соответствующие фазово-контрастные изображения клеток WT и *cox12Δ* были получены на флуоресцентном микроскопе («Olympus»). **b** – Для определения чувствительности к окислительному стрессу клетки WT и *cox12Δ*, обработанные 2,5 мМ H₂O₂, наносили на чашки со средами YPD и SCD. **c** – Аэробный рост клеток WT и *cox12Δ* в присутствии 25 мМ NAC в среде YPGE через 2–5 дней

вызвать образование АФК [36]. Клетки, у которых отсутствовал ген *COX12*, демонстрировали слабый рост на чашках со средами YPD и SCD в присутствии 2,5 мМ H_2O_2 (рис. 4, *b*), что предполагает, что клетки *cox12Δ* чувствительны к окислительному стрессу, индуцированному H_2O_2 . Однако добавка тушителя активных форм кислорода NAC (25 мМ) не привела к восстановлению роста клеток *cox12Δ* на аэробной среде YPGE (рис. 4, *c*).

Компьютерный анализ партнёров по взаимодействию Cox12. Чтобы получить более полное представление о предполагаемой функции Cox12, мы выполнили *in silico* моделирование доступных структур SC из *S. cerevisiae* (PDB IDs 6T0B и 6T15) [29] для идентификации сети взаимодействий субъединицы Cox12. Было показано, что Cox12 образует водородные связи с тремя субъединицами CIV (Cox1, Cox2 и Cox6a/Cox13) и одним фактором SC (Rcf2) (рис. 5, *a–e*; табл. 2), помимо уже известной субъединицы Cox3 [5]. Cox12 имеет 8 контакт-

ных сайтов для каталитической субъединицы Cox2. Среди них в Cox12 есть 4 консервативных а.о., которые также присутствуют в COX6B1 человека (табл. 2). Однако эти остатки не взаимодействуют непосредственно с каталитическим центром Cu_A . Аминокислотные остатки Q21 и Q23 Cox12 участвуют в формировании структурного микроокружения, которое стабилизирует центр Cu_A Cox2 (рис. 5, *c*). Два других контактных сайта предназначены для Cox1 и Cox13 соответственно. Предположительно, они ответственны за правильное функционирование белка (рис. 5, *d*, табл. 2). Cox12 также взаимодействует с C-концевым участком Rcf2, расположенным после домена белка индуцируемого гипоксией гена (HIG) (рис. 5, *e*). Было показано, что это взаимодействие необходимо для рекрутинга Cox12 в модуль Cox3 во время сборки CIV (табл. 2) [29]. Анализ данных, полученных по SC III_2IV_2 , показал, что сайт (K49) взаимодействия с Rcf2 (E199) находится внутри мотива $CX_{10}C$ Cox12 (рис. 5, *e* и табл. 2). В суперком-

Таблица 2. Аминокислотные остатки Cox12, взаимодействующие с другими субъединицами CIV и фактором сборки SC

Аминокислотные остатки Cox12	Взаимодействующие остатки субъединицы	Образование связей между цепями	Обнаружены в суперкомплексах	Предполагаемые функции
T11*	Cox2–A114	A114 с H174	III_2IV_1 (PDB ID: 6T15) III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
V12	Cox2–S112	R176 с T116 R176 с M115 и I117	III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
G13	Cox2–R176		III_2IV_1 (PDB ID: 6T15)	стабилизирует центр Cu_A
G13	Cox2–R176		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
Q20	Cox2–Q206		III_2IV_1 (PDB ID: 6T15)	стабилизирует центр Cu_A
Q21*	Cox2–D108, Q206		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
Q21*	Cox1–R302 Cox2–Q206		III_2IV_1 (PDB ID: 6T15)	стабилизирует микроокружение вблизи Cu_A и Cu_B
Q23*	Cox2–L204	S131 с K118 K118 с E129 и S131 S131 с T116 и E129 Y122 с W124	III_2IV_1 (PDB ID: 6T15) III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
Q29*	RCF2–R187		III_2IV_1 (PDB ID: 6T15)	стабилизирует COX-содержащий SC
D33*				
K49	RCF2–E199		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует COX-содержащий SC
K53	Cox2–D132		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
N56	Cox2–S131		III_2IV_1 (PDB ID: 6T15)	стабилизирует центр Cu_A
A57	Cox2–K118		III_2IV_1 (PDB ID: 6T15)	стабилизирует центр Cu_A
A57	Cox2–S131		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
D62	Cox2–Y122		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует центр Cu_A
F76*	Cox13/COX6A–Y96		III_2IV_2 (PDB ID: 6T0B)	стабилизирует мономерную структуру COX

Примечание. * Эволюционно консервативные а.о.

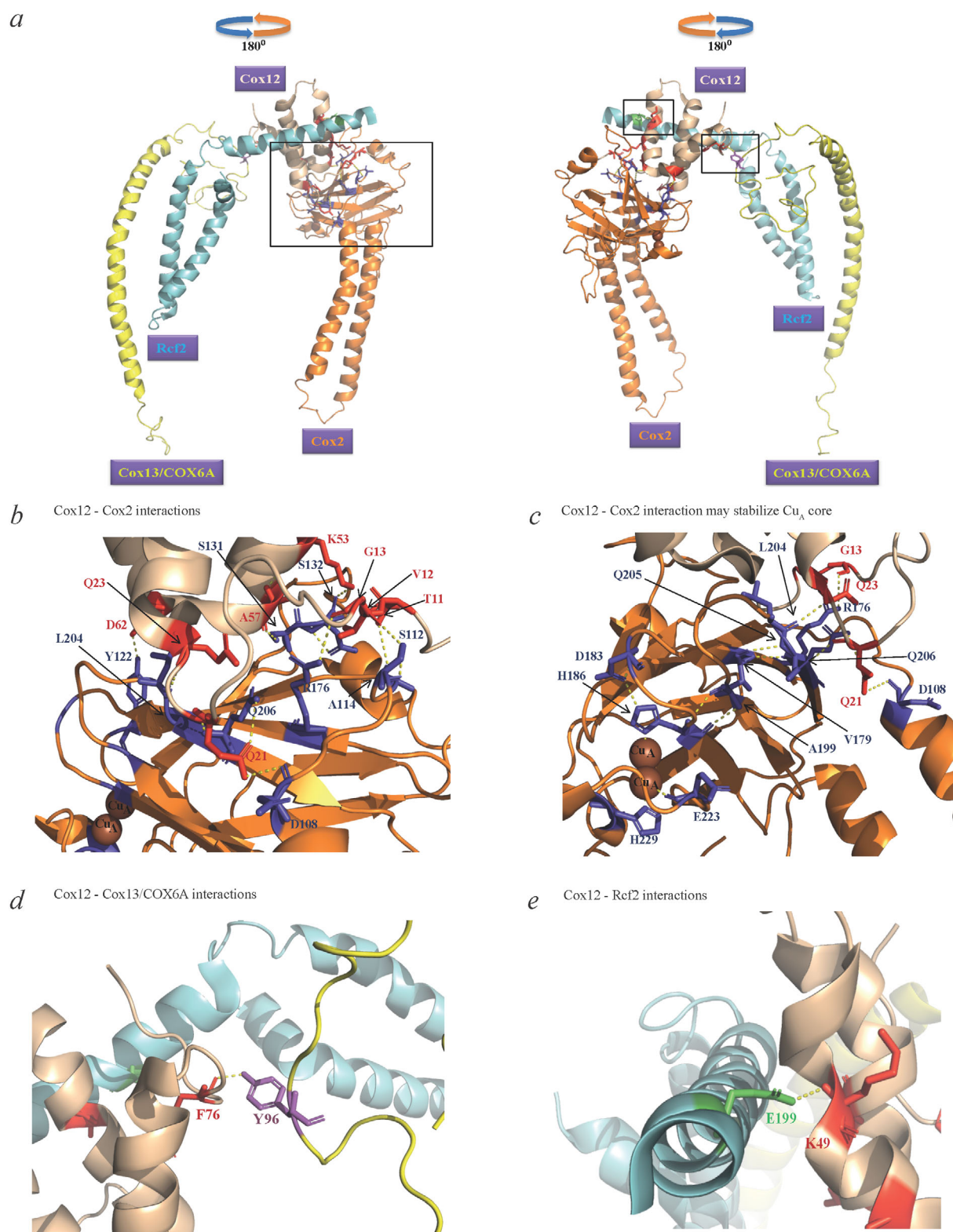


Рис. 5. Анализ *in silico* подтверждает, что взаимодействия Cox12 важны для функционирования CIV. *a* – Cox12 и 3 взаимодействующих с ним партнёра (Cox2, Cox13 и Rcf2) смоделированы из структур крио-ЭМ SC (идентификаторы PDB: 6T0B и 6T15). Субъединицы CIV и фактор сборки суперкомплекса Rcf2 показаны различным цветом. *b* – Взаимодействия между аминокислотными остатками Cox12 и Cox2 (показаны красным и фиолетовым цветом соответственно). *c* – Каталитический карман, образуемый между остатками Cox2 и Cox12, который может стабилизировать каталитическое микроокружение на сайте Cu_A Cox2. Три а.о., окрашенных фиолетовым цветом (H186, E223, H229) являются сайтами Cox2, координируемые по Cu_A. *d–e* – Взаимодействия Cox12 с Cox13 (показаны жёлтым цветом) (*d*) и с Rcf2 (показаны зелёным цветом) (*e*)

плексе III₂IV сайт (Q49, D33) взаимодействия с Rcf2 (R187) локализован внутри мотива CX₉C Cox12 (табл. 2). В целом эти данные позволяют предположить, что Cox12 взаимодействует с двумя каталитическими субъединицами и одной структурной субъединицей и также с одним фактором SC, которые могут регулировать функционирование CIV.

Мутации R17H и R17C могут нарушить функционирование Cox12. Были сообщения о трёх мутациях двух а.о., R20 и T81, белка COX6B1 человека [18–20]. Среди этих остатков R20 консервативен в дрожжах (R17 в Cox12 дрожжей) (рис. 1, а). Мы сконструировали два мутанта, R17C и R17H (аналогично мутациям в белках человека), в векторе pRS416-GPD и протестировали их способность к восстановлению аэробного роста клеток *cox12Δ* в дыхательной среде, содержащей глицерин и этанол. Мы обнаружили, что оба мутанта лишь частично восстанавливают аэробный рост клеток *cox12Δ*. Наблюдаемая пролонгированная лаг-фаза кривой роста клеток (рис. 6, а и б) позволяет предположить, что остаток R17 очень важен для функционирования Cox12.

SDS-ПААГ с последующим иммуноблоттингом цитозольной и митохондриальной фракций показали, что экспрессируемые в эписомах мутантные белки локализованы в митохондриях. Однако мутация R17H значительно снижает стационарную митохондриальную экспрессию Cox12 по сравнению с клетками WT и трансформантами R17C, что может быть связано с дефектом импорта в митохондрии этого белка либо с его пониженной стабильностью. Интересно, что мутация R17C не вызывала изменений в стационарной экспрессии белка в митохондриях, но не устраняла дефект роста клеток *cox12Δ* (рис. 6, с).

Мутации R17H и R17C влияют на биоэнергетику митохондрий и чувствительность клеток к окислительному стрессу. Используя BN-ПААГ и последующий вестерн-блоттинг, нами было показано, что мутация R17H серьёзно нарушает сборку Cox12 в SC III₂IV₂ и III₂IV₁. В то же самое время у мутантов R17C не наблюдалось значительного снижения сборки SC (рис. 7, а). Поскольку антисыворотка против пептидов Cox12 не выявила Cox12 в нативных SC, мы использовали белок Cox12HA для изучения ассоциации Cox12 с SC. Мы также измерили OCR в клетках *cox12Δ*, трансформированных геном *COX12HA* или его мутантными формами *R17H* и *R17C* с использованием электрода Кларка для полярографического определения O₂. Как и ожидалось, в клетках *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором, наблюдалось снижение базальной

OCR более чем на 70% по сравнению с клетками WT. OCR в клетках *cox12Δ*, экспрессирующих Cox12, была схожа с OCR в клетках WT. OCR для мутантных форм R17H и R17C была снижена на 56 и 30% соответственно по сравнению с клетками WT (рис. 7, б и с). Кроме того, клетки *cox12Δ*, трансформированные пустым вектором, были чрезвычайно чувствительны к окислительному стрессу и не могли расти на чашках со средой SCD (-URA) после обработки H₂O₂. Сходная чувствительность к действию H₂O₂ наблюдалась в клетках *cox12Δ*, трансформированных мутантами *R17H* и *R17C*. Однако экспрессия гена *COX12* дикого типа в клетках *cox12Δ* полностью подавляла фенотипы, чувствительные к действию H₂O₂ (рис. 7, д). Следовательно, наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что обе мутации, наблюдаемые у людей (R17H и R17C), могут быть причиной развития патогенеза заболевания, уменьшая дыхание и вызывая окислительный стресс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биогенез митохондриальной электрон-транспортной цепи является чрезвычайно сложным процессом, в котором задействовано более 92 субъединиц [37]. Однако, помимо каталитических субъединиц, содержащих редокс-центры, точная роль отдельных субъединиц остаётся неясной. Это ограничивает не только наше понимание процесса образования энергии, но также является основным препятствием для проведения связи между структурными генами ЭТЦ, участвующими в развитии различных патологий, и их биологическими функциями. В этом исследовании мы использовали дрожжевую модель дефицита Cox12, чтобы установить патофизиологическую и дыхательную роли этого белка.

Нами было показано, что делеция субъединицы CIV Cox12 приводит к заметной потере дрожжевыми клетками способности к росту в аэробных условиях (рис. 1, б–д). Гены *COX12* дрожжей или *COX6B1* человека, внедрённые в клетки *cox12Δ*, в полной мере восстанавливали дыхательный фенотип этих клеток, подтверждая, что белки, кодируемые этими генами, являются ортологами (рис. 1, е). Фенотипический анализ также выявил, что мутантные формы Cox12 (R17H и R17C) лишь частично дополняют функции Cox12 в клетках WT (рис. 6 и 7).

При изучении причины снижения уровня дыхательного роста клеток *cox12Δ* мы обнаружили, что в отличие от COX-дефицитных клеток *coa6Δ*, стационарная экспрессия факторов SC (Rcf1 и Rcf2) и субъединиц CIII (Rip1) и

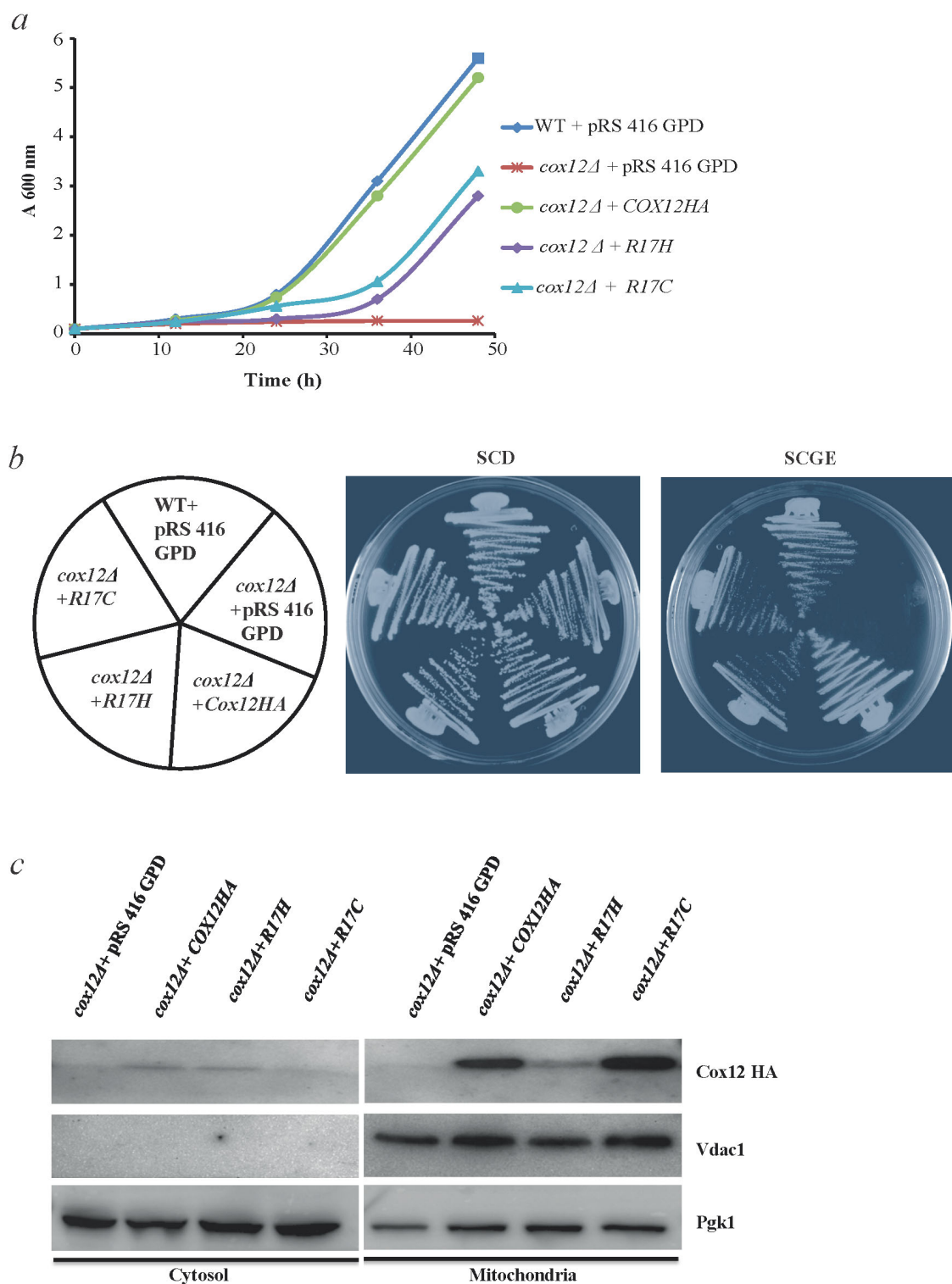


Рис. 6. Клетки *cox12Δ* из *S. cerevisiae*, экспрессирующие мутантные белки Cox12 с аминокислотными заменами R17H и R17C, показывают замедленный аэробный рост. **a** – Кривые роста клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором pRS416-GPD или векторами, несущими гены *COX12HA*, *R17H* или *R17C*. Клетки выращивали в среде SCD (-URA), затем их инокулировали в свежую среду SCGE (-URA) до $A_{600} = 0,1$. Рост клеток при 30 °C регистрировали через обозначенные интервалы времени. Клетки WT, трансформированные плазмидой pRS416-GPD, использовали в качестве контроля. **b** – Трансформированные клетки помещали на чашки со средами SCD и SCGE и инкубировали в течение 2–5 дней перед визуализацией. **c** – Иммуноблоттинг митохондриальных и цитозольных экстрактов клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором, *COX12HA* и мутантными генами. Pgk1 и Vdac1 использовали как цитозольные и митохондриальные маркеры соответственно

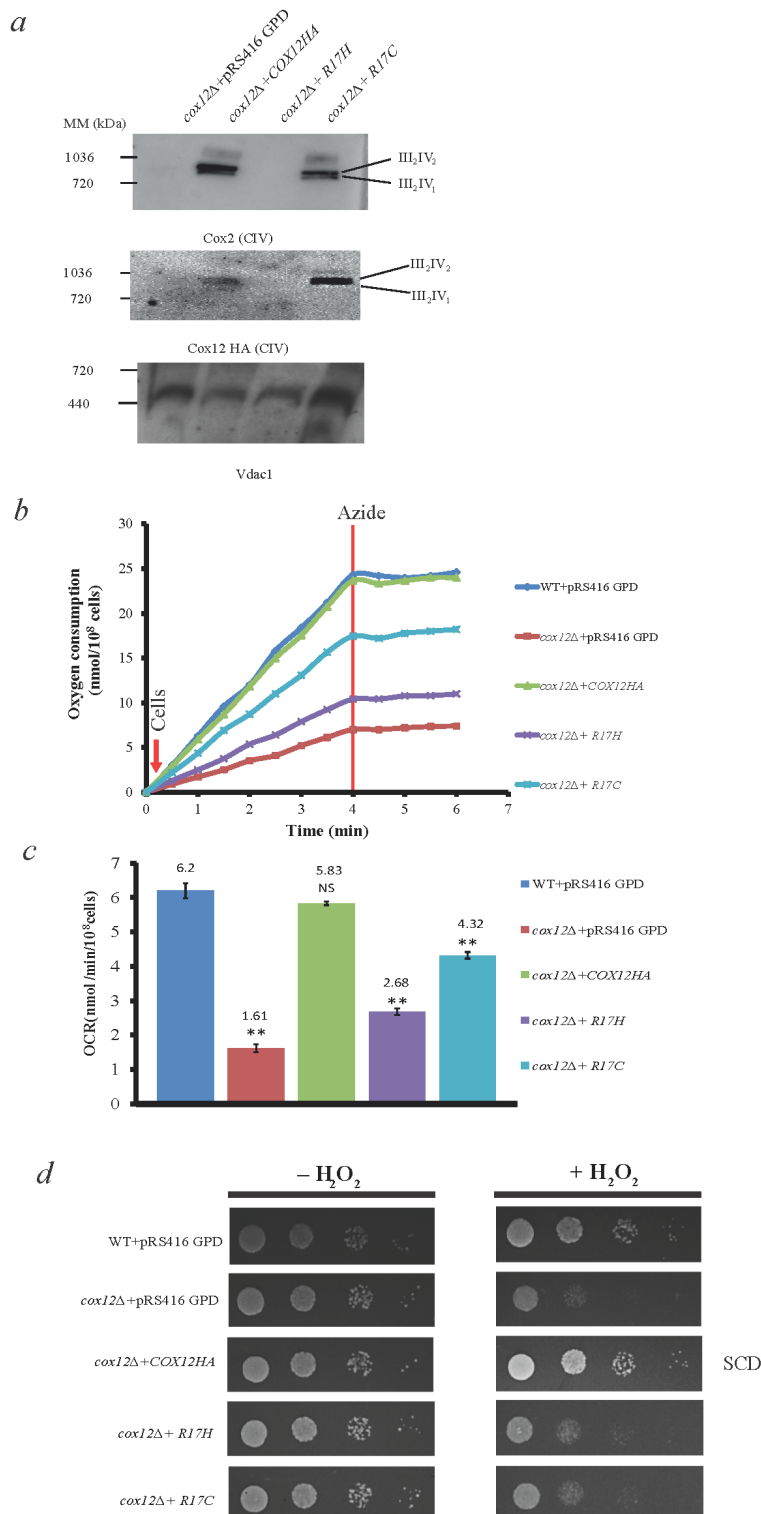


Рис. 7. Влияние мутаций R17H и R17C на митохондриальное дыхание и чувствительность клеток *S. cerevisiae* к окислительному стрессу. **a** – BN-ПААГ/иммуноблоттинг образцов митохондрий (20 мкг), солюбилизированных 2%-ным дигитонином и разделённых в 3–13%-ном градиентном Bis-Tris-геле с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против Cox2 и Cox12HA. Vdac1 был использован в качестве контроля загрузки. **b** – Эндогенное клеточное дыхание WT + pRS416 GPD, *cox12Δ* + pRS416 GPD, *cox12Δ* + COX12HA, *cox12Δ* + R17H и *cox12Δ* + R17C, измеряемое при концентрации 10^8 клеток/мл в среде SCD (-URA) при 30 °C. Через 4 мин для блокировки дыхания добавляли азид натрия (1 mM) (вертикальная линия). **c** – Значения OCR были рассчитаны как минимум по трём независимым экспериментам. **d** – Чувствительность к окислительному стрессу определяется обработкой вышеуказанных штаммов 2,5 mM H_2O_2 и последующим нанесением клеток на среду SCD (-URA). Изображения были получены через 2 дня роста клеток

CIV (Cox1–4) в клетках *cox12Δ* не отличалась от клеток WT (рис. 2, *a*). BN-ПААГ/вестерн-блоттинг с использованием антител против Rip1 и Cox1 не выявил заметного снижения количества суперкомплексов III_2IV_2 и III_2IV_1 в клетках *cox12Δ* (рис. 2, *b*). Интересно, что количество субъединицы Cox2 в SC снижалось на 50% по сравнению с клетками WT. Делеция Cox12 не сказывается на синтезе и стабильности свободной субъединицы CIV (рис. 2, *a*). Следовательно, эти субъединицы могут образовывать неполный холокомплекс CIV (без Cox12), который может далее связываться с CIII_2 с образованием SC (рис. 2, *b*). Либо отсутствие Cox12 нарушает включение на поздних стадиях субъединицы CIV (например, Cox2), либо стабилизация Cox12 в SC нарушается. В любом случае каталитическая активность CIV в клетках *cox12Δ* существенно нарушена (рис. 2, *c* и *d*).

Интересно, что мы также выявили дифференциальную экспрессию факторов дыхательных SC (Rcf1 и Rcf2) в суперкомплексах III_2IV_2 и III_2IV_1 клеток *cox12Δ*: уровень Rcf1 повышался, в то время как уровень Rcf2 был понижен (рис. 2, *b*). Роль факторов Rcf1 и Rcf2 остаётся невыясненной. Было показано, что ортолог Rcf1 у человека (HIGD1A) необходим на поздних стадиях биогенеза CIII_2 и на начальной стадии биогенеза CIV. Человеческий ортолог Rcf2 (HIGD2A) крайне необходим на поздней стадии биогенеза CIV [38, 39]. Однако роли дрожжевых Rcf1 и Rcf2 в регуляции активности CIV перекрываются [40]. Сейчас возникает вопрос: почему уровни Rcf1 и Rcf2 изменились в SC клеток *cox12Δ* по сравнению с клетками WT? Может быть два ответа. Во-первых, Rcf1 может связываться с CIV на очень ранней стадии сборки CIV, тогда как Rcf2 участвует в привлечении или стабилизации Cox12 на поздней стадии сборки CIV [29]. Следовательно, при отсутствии Cox12 интеграция Rcf2 в SC нарушается. Альтернативная возможность состоит в том, что Rcf1 и Rcf2 являются положительным и отрицательным модуляторами активности CIV соответственно [41]. Следовательно, чтобы компенсировать пониженную активность CIV в клетках *cox12Δ*, уровень Rcf1 должен повышаться, а уровень Rcf2 должен понижаться.

Анализ биоэнергетики клетки показал, что потеря гена *COX12* снижает базальную OCR клетки на 90% и значительно снижает максимальную респираторную ёмкость клеток (в присутствии СССР) (рис. 3, *a–d*). Стимулируемое сукцинатом комбинированное дыхание C(II + V) было затруднено на 84% по сравнению с дыханием клеток WT (рис. 3, *b*). Интересно, что дыхательная активность CIV при 1,4 мМ TMPD и

аскорбате снижалась лишь на 29% (рис. 3, *d*). Это можно объяснить тем, что TMPD при более высоких концентрациях непосредственно переносит электроны на центр Cu_A /гем *a* в CIV в обход цитохрома *c* [42]. Следовательно, возможно, отсутствие Cox12 может вызывать дефекты в сайте стыковки цитохрома *c* CIV и препятствовать потоку электронов от цитохрома *c* к центру Cu_A .

Анализ с помощью программы PyMol показал, что Cox12 располагается на противоположной стороне интерфейса CIV– CIII в обоих SC. Следовательно, отсутствие Cox12 не мешает формированию SC. Более того, анализ белок-белковых взаимодействий показал, что Cox12 взаимодействует с каталитическими субъединицами CIV, регулирующими поток электронов (рис. 5 и табл. 2). Мы обнаружили, что остатки Q21 и Q23 в Cox12 обеспечивают стабильность каталитического координационного сайта Cu_A через сеть не прямых взаимодействий с остатками Q206 и L204 субъединицы Cox2 соответственно (табл. 2). Эти остатки помогают координировать правильную ориентацию лигандов Cu_A (H186, E223 и H229) Cox2. Было обнаружено, что остаток D62, специфичный для Cox12 грибов, взаимодействовал с остатком Y122 Cox2, расположенным в непосредственной близости от одного из остатков (Y125) сайта докинга цитохрома *c* (рис. 5, *b*). Cox12 также связывается с Rcf2, который взаимодействует с другими субъединицами CIV (Cox3 и Cox13), имеющими значение для сайта докинга цитохрома *c* [29] (рис. 5, *e*). В целом эти данные говорят о том, что Cox12 действует как «мост» между модулями Cox2 и Cox3. Следовательно, делеция Cox12 может нарушить ассоциацию/стабильность Cox2 в SC, что предотвращает формирование правильного кармана для связывания цитохрома *c* в CIV.

Дисфункции отдельных комплексов ЭТЦ и биогенеза SC часто связаны с активацией генерации АФК [43–45]. Митохондрии являются основным источником образования АФК в клетке [46]. Нами было показано, что отсутствие Cox12 приводит к нарушениям роста дрожжей в результате H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса (рис. 4, *b*) и приводит к деполяризации митохондриальной мембраны (рис. 4, *a*). Пониженный мембранный потенциал митохондрий может вызвать запуск митофагии, что приводит к уменьшению числа митохондрий. Однако это предположение следует проверить [47]. Поскольку НАС не был способен восстановить дыхательный рост клеток *cox12Δ* (рис. 4, *c*), нарушение регуляции образования АФК может быть не единственной причиной

возникновения дефекта респираторного роста клеток *cox12Δ*.

В заключение, делеция гена *COX12* приводит к нарушению респираторного роста клеток дрожжей. Ортолог человека, *COX6B1*, может дополнить функцию *COX12* у дрожжей. Однако белки Cox12 с аминокислотными заменами R17H и R17C (аналоги мутаций *COX6B1*, наблюдаемые у людей) не смогли дополнить дыхательную функцию гена *COX12* (рис. 6 и 7). Поскольку субъединица Cox12 встраивается лишь после сборки модулей Cox1 и Cox2, мы показали, что в клетках *cox12Δ* синтезированный недостроенным C1V может связываться с CIII₂ с образованием суперкомплексов III₂IV₂ и III₂IV₁. Однако эти SC ферментативно неактивны, предположительно, из-за дестабилизации сайта докинга цитохрома *c*. В результате в клетках *cox12Δ* сукцинат-стимулированная OCR митохондрий понижена на 84%. Интересно, что добавка миллимолярных концентраций TMPD/аскорбата частично восстанавливала потребление кислорода, вероятно, за счёт усиления потока электронов через недостроенные SC. *In silico* анализ белок-белковых взаимодействий показал, что Cox12 встраивается в SC и образует контакты с Cox2 и Rcf2. Методом BN-ПААГ было показано, что отсутствие Cox12 затрудняет связывание Cox2 и Rcf2 с суперкомплексами. Следовательно, эти функционально дефектные недостроенные дыхательные комплексы могут замедлять скорость потока электронов через ЭТЦ и снижать мем-

бранный потенциал митохондрий в клетках *cox12Δ*, что может играть роль в возникновении патологий, ассоциированных с дефицитом Cox12.

Финансирование. Данная работа была поддержана DST-SERB (ECR/2016/001127), правительством Индии и грантами ВІ Калькуттского университета для AG; стипендией UGC-JRF (MAY2018-353734) для SM и стипендией CSIR-JRF (09/028 (1127)/2019-EMR-I) для MB.

Благодарности. Авторы выражают благодарность докторам С. Мейсингеру, Мартину Отту и Винсенцо Зара за любезно предоставленные ими препараты антител. Мы хотели бы выразить благодарность доктору Каусику Чакраборти, IGIB, Индия за получение штаммов дрожжей с делециями. Мы также благодарны Д.К. Бозе и Н. Сингху за техническую помощь в приготовлении текста настоящей статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит результаты каких-либо работ с участием людей или лабораторных животных, выполненных с участием кого-либо из её авторов.

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 86, вып. 12, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rak, M., Benit, P., Chretien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., et al. (2016) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase deficiency, *Clin. Sci. (Lond)*, **130**, 393-407, doi: 10.1042/CS20150707.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J., and Barrientos, A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome *c* oxidase catalytic core, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 883-897, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.005.
- Barros, M. H., and McStay, G. P. (2020) Modular biogenesis of mitochondrial respiratory complexes, *Mitochondrion*, **50**, 94-114, doi: 10.1016/j.mito.2019.10.008.
- Mukherjee, S., and Ghosh, A. (2020) Molecular mechanism of mitochondrial respiratory chain assembly and its relation to mitochondrial diseases, *Mitochondrion*, **53**, 1-20, doi: 10.1016/j.mito.2020.04.002.
- Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2017) Cox16 protein is physically associated with Cox1p assembly intermediates and with cytochrome oxidase, *J. Biol. Chem.*, **292**, 16277-16283, doi: 10.1074/jbc.M117.801811.
- Vidoni, S., Harbour, M. E., Guerrero-Castillo, S., Signes, A., Ding, S., et al. (2017) MR-1S interacts with PET100 and PET117 in module-based assembly of human cytochrome *c* oxidase, *Cell Rep.*, **18**, 1727-1738, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.044.
- Zong, S., Wu, M., Gu, J., Liu, T., Guo, R., and Yang, M. (2018) Structure of the intact 14-subunit human cytochrome *c* oxidase, *Cell Res.*, **28**, 1026-1034, doi: 10.1038/s41422-018-0071-1.
- Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H., et al. (2010) Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome *c* oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b, *Biochem. J.*, **428**, 363-374, doi: 10.1042/BJ20091714.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., et al. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **269**, 1069-1074, doi: 10.1126/science.7652554.
- Letts, J. A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L. A. (2016) The architecture of respiratory supercomplexes, *Nature*, **537**, 644-648, doi: 10.1038/nature19774.
- Timon-Gomez, A., Nyvtova, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., and Barrientos, A. (2018) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase biogenesis: recent developments, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **76**, 163-178, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.055.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes, *Mol. Cell*, **32**, 529-539, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.

13. Khalimonchuk, O., and Winge, D. R. (2008) Function and redox state of mitochondrial localized cysteine-rich proteins important in the assembly of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 618-628, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.016.
14. Kim, S. E., Mori, R., Komatsu, T., Chiba, T., Hayashi, H., et al. (2015) Upregulation of cytochrome *c* oxidase subunit 6b1 (Cox6b1) and formation of mitochondrial supercomplexes: implication of Cox6b1 in the effect of calorie restriction, *Age (Dordr)*, **37**, 9787, doi: 10.1007/s11357-015-9787-8.
15. Modjtahedi, N., Tokatlidis, K., Dessen, P., and Kroemer, G. (2016) Mitochondrial proteins containing coiled-coil-helix-coiled-coil-helix (CHCH) domains in health and disease, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 245-260, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.004.
16. Yang, S., Wu, P., Xiao, J., and Jiang, L. (2019) Overexpression of COX6B1 protects against I/R-induced neuronal injury in rat hippocampal neurons, *Mol. Med. Rep.*, **19**, 4852-4862, doi: 10.3892/mmr.2019.10144.
17. Nie, K., Li, J., He, X., Wang, Y., Zhao, Q., et al. (2020) COX6B2 drives metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation to promote metastasis in pancreatic ductal cancer cells, *Oncogenesis*, **9**, 51, doi: 10.1038/s41389-020-0231-2.
18. Abdulhag, U. N., Soiferman, D., Schueler-Furman, O., Miller, C., Shaag, A., et al. (2015) Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy, *Eur. J. Hum. Genet.*, **23**, 159-164, doi: 10.1038/ejhg.2014.85.
19. Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., et al. (2012) Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 118ra110, doi: 10.1126/scitranslmed.3003310.
20. Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., et al. (2008) Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome *c* oxidase, *Am. J. Hum. Genet.*, **82**, 1281-1289, doi: 10.1016/j.ajhg.2008.05.002.
21. Baertling, F., Brand, M. A. M., Hertecant, J. L., Al-Shamsi, A., Heuvel, L. P., et al. (2015) Mutations in COA6 cause cytochrome *c* oxidase deficiency and neonatal hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, **36**, 34-38, doi: 10.1002/humu.22715.
22. Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., et al. (2016) Mitochondrial diseases, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2**, 16080, doi: 10.1038/nrdp.2016.80.
23. Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., et al. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology, *Cell*, **134**, 112-123, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.016.
24. Vondrackova, A., Vesela, K., Hansikova, H., Docekalova, D. Z., Rozsypalova, E., et al. (2012) High-resolution melting analysis of 15 genes in 60 patients with cytochrome-*c* oxidase deficiency, *J. Hum. Genet.*, **57**, 442-448, doi: 10.1038/jhg.2012.49.
25. Zhang, W., Wang, Y., Wan, J., Zhang, P., and Pei, F. (2019) COX6B1 relieves hypoxia/reoxygenation injury of neonatal rat cardiomyocytes by regulating mitochondrial function, *Biotechnol. Lett.*, **41**, 59-68, doi: 10.1007/s10529-018-2614-4.
26. LaMarche, A. E., Abate, M. I., Chan, S. H., and Trumpower, B. L. (1992) Isolation and characterization of COX12, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 22473-22480.
27. Ghosh, A., Pratt, A. T., Soma, S., Theriault, S. G., Griffin, A. T., et al. (2016) Mitochondrial disease genes COA6, COX6B and SCO2 have overlapping roles in COX2 biogenesis, *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 660-671, doi: 10.1093/hmg/ddv503.
28. Ghosh, A., Trivedi, P. P., Timbalia, S. A., Griffin, A. T., Rahn, J. J., et al. (2014) Copper supplementation restores cytochrome *c* oxidase assembly defect in a mitochondrial disease model of COA6 deficiency, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3596-3606, doi: 10.1093/hmg/ddu069.
29. Hartley, A. M., Meunier, B., Pinotsis, N., and Marechal, A. (2020) Rcf2 revealed in cryo-EM structures of hypoxic isoforms of mature mitochondrial III-IV supercomplexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 9329-9337, doi: 10.1073/pnas.1920612117.
30. Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R. A. (2012) Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome *bc*₁-cytochrome *c* oxidase supercomplex, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 1363-1373, doi: 10.1128/MCB.06369-11.
31. Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vogtle, F. N., Meisinger, C., et al. (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex, *Cell Metab.*, **15**, 336-347, doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.016.
32. Meisinger, C., Pfanner, N., and Truscott, K. N. (2006) Isolation of yeast mitochondria, *Methods Mol. Biol.*, **313**, 33-39, doi: 10.1385/1-59259-958-3:033.
33. Wittig, I., Karas, M., and Schagger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes, *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1215-1225, doi: 10.1074/mcp.M700076-MCP200.
34. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., and Angelini, C. (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells, *Nat. Protoc.*, **7**, 1235-1246, doi: 10.1038/nprot.2012.058.
35. Jamar, N. H., Kritsiligkou, P., and Grant, C. M. (2017) The non-stop decay mRNA surveillance pathway is required for oxidative stress tolerance, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6881-6893, doi: 10.1093/nar/gkx306.
36. Brand, M. D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Exp. Gerontol.*, **45**, 466-472, doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003.
37. Chinnery, P. F., and Hudson, G. (2013) Mitochondrial genetics, *Br. Med. Bull.*, **106**, 135-159, doi: 10.1093/bmb/ldt017.
38. Fernandez-Vizarra, E., and Zeviani, M. (2018) Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly, *Cell Cycle*, **17**, 681-687, doi: 10.1080/15384101.2017.1417707.
39. Timon-Gomez, A., Garlich, J., Stuart, R. A., Ugalde, C., and Barrientos, A. (2020) Distinct roles of mitochondrial HIGD1A and HIGD2A in respiratory complex and supercomplex biogenesis, *Cell Rep.*, **31**, 107607, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107607.
40. Strogolova, V., Hoang, N. H., Hosler, J., and Stuart, R. A. (2019) The yeast mitochondrial proteins Rcf1 and Rcf2 support the enzymology of the cytochrome *c* oxidase complex and generation of the proton motive force, *J. Biol. Chem.*, **294**, 4867-4877, doi: 10.1074/jbc.RA118.006888.
41. Dawitz, H., Schafer, J., Schaart, J. M., Magits, W., Brzezinski, P., and Ott, M. (2019) Rcf1 modulates cytochrome *c* oxidase activity especially under energy-demanding conditions, *Front. Physiol.*, **10**, 1555, doi: 10.3389/fphys.2019.01555.

42. Hochman, J. H., Partridge, B., and Ferguson-Miller, S. (1981) An effective electron donor to cytochrome oxidase. Purification, identification, and kinetic characterization of a contaminant of ruthenium red, hexaamineruthenium II/III, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8693-8698.
43. Diaz, F., Enriquez, J. A., and Moraes, C. T. (2012) Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 415-429, doi: 10.1128/MCB.06051-11.
44. Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C. T. (2006) Cytochrome *c* oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts, *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4872-4881, doi: 10.1128/MCB.01767-05.
45. Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., et al. (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13063-13068, doi: 10.1073/pnas.1613701113.
46. Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., and Soldati, T. (2015) Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis, *Redox Biol.*, **6**, 472-485, doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005.
47. Knorre, D. A., and Severin, F. F. (2012) Longevity and mitochondrial membrane potential, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 793-794, doi: 10.1134/S0006297912070127.

MUTATIONS IN THE YEAST Cox12 SUBUNIT SEVERELY COMPROMISE THE ACTIVITY OF THE MITOCHONDRIAL COMPLEX IV

S. Das, S. Mukherjee, M. Bedi, and A. Ghosh*

*Department of Biochemistry, University of Calcutta, 35 Ballygunge Circular Road,
Pin-700019, Kolkata, India; e-mail: alok.caluni@gmail.com*

Cytochrome *c* oxidase 6B1 (COX6B1) is one of the less characterized subunits of the mitochondrial electron transport chain complex IV (CIV). Here, we studied the pathobiochemical and respiratory functions of Cox12 (yeast ortholog of COX6B1) using *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*cox12Δ*) cells deficient by the Cox12 protein. The cells exhibited severe growth deficiency in the respiratory glycerol-ethanol medium, which could be reverted by complementation with the yeast *COX12* or human *COX6B1* genes. Cox12 with arginine 17 residue substituted by histidine (R17H) or cysteine (R17C) (mutations analogous to those observed in human patients) failed to complement the loss of Cox12 function. When *cox12Δ* cells were grown in rich respiratory/fermentative galactose medium, no changes in the expression of respiratory chain subunits were observed. Blue native PAGE/Western blotting analysis using antibodies against Rpl1 and Cox1, which are specific components of complexes III (CIII) and IV (CIV), respectively, revealed no noticeable decrease in the native CIII₂CIV₂ and CIII₂CIV₁ supercomplexes (SCs). However, the association of the respiratory SC factor 2 (Rcf2) and Cox2 subunit with the SCs in *cox12Δ* cells was reduced, while the specific activity of CIV was downregulated by 90%. Both basal respiration and succinate-ADP stimulated respiration in state 3, as well as the mitochondrial membrane potential, were decreased in *cox12Δ* cells. Furthermore, *cox12Δ* cells and cells synthesizing Cox12 mutants R17H and R17C showed higher sensitivity to the H₂O₂-induced oxidative stress compared to the wild-type (WT) cells. *In silico* structural modeling of the WT yeast SCs revealed that Cox12 forms a network of interactions with Rcf2 and Cox2. Together, our results establish that Cox12 is essential for the CIV activity.

Keywords: cytochrome *c* oxidase 6B1, Cox12, complex IV, supercomplexes

УДК 573.554

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА И ТРАНСЛЯЦИИ В РАМКАХ СОВРЕМЕННЫХ КОНЦЕПЦИЙ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЖИЗНИ

Обзор

© 2022 Л.Г. Кондратьева¹, М.С. Дьячкова², А.В. Гальченко^{3*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

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

³ Российский университет дружбы народов (РУДН), 117198 Москва, Россия;
электронная почта: gav.jina@gmail.com

Поступила в редакцию 26.05.2021

После доработки 10.11.2021

Принята к публикации 08.12.2021

Происхождение генетического кода и системы трансляции, возможно, является центральной и самой трудной проблемой в изучении происхождения жизни и одной из самых трудных во всей эволюционной биологии. Существует большое количество гипотез возникновения и развития современных генетических систем, затрагивающих происхождение и раннюю эволюцию генетического кода, а также возникновение репликации и трансляции. Наиболее широко известные гипотезы рассмотрены в данном обзоре. Однако ни одна из этих гипотез не описывает без пробелов и допущений все этапы ранней эволюции генетических систем. Гипотеза РНК-мира является главенствующей на сегодняшний день научной идеей о ранней эволюции биологических и пребиологических объектов. Главное её преимущество заключается в том, что она предлагает в качестве первых живых систем РНК как самодостаточные, с точки зрения воспроизведения, молекулы, которые способны функционировать как каталитический компонент системы и в то же время – как матричный. Однако есть и существенные недостатки. В частности, до сих пор не открыта и не получена экспериментально рибозимная процессивная полимераз. Учитывая взаимную потребность белков и нуклеиновых кислот в современном мире, многие авторы предлагают сценарии ранней эволюции на основе коэволюции этих двух классов органических молекул. Подобные гипотезы постулируют, что для репликации нуклеиновых кислот было необходимо возникновение трансляции, в отличие от мира РНК, где появлению трансляции предшествовала эра самореплицирующихся РНК. И хотя такие сценарии менее экономичны, с эволюционной точки зрения, так как требуют одномоментного появления и эволюции сразу двух классов органических молекул, а также синхронизации по времени появления репликации и трансляции, большим их преимуществом является то, что они предлагают развитие сразу гораздо более точной и процессивной белковой репликации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эволюция, зарождение жизни, трансляция, генетический код, РНК-мир, проген, белковый мир, липидный мир.

DOI: 10.31857/S0320972522010043

ВВЕДЕНИЕ

Земля сформировалась ~4,5 миллиарда лет назад, и вскоре после этого, ~4 миллиарда лет назад [1], сложившиеся на планете условия при-

вели к появлению особого состояния материи, которое мы называем жизнью. По определению NASA, жизнь – это «самоподдерживающаяся химическая система, способная к дарвиновской эволюции» [2]. Для реализации данной способности появился первобытный генетический код, который обеспечил трансляцию нуклеиновых кислот в белки. Для объяснения потенциальных механизмов зарождения генетических систем было предложено большое количество различных гипотез, каждая из которых делает акцент на различных событиях, приводящих к возникновению функциональной трансляции и самоподдерживающейся системы. Они описывают как происхождение генетического кода,

Принятые сокращения: aaRS – аминоксил-тРНК-синтетаза; DRT – прямое кодирование аминокислот с РНК-матрицы; C-DRT – цепь, комплементарная DRT-матрице; GADV – модель эволюции белкового мира; GARD – модель репликации мицеллярного автокатализа; PR – шкала растворимости аминокислот в пиридине (PolarRequirement); Self-rARS – самоаминоацилирующие рибозимы; SART – самоаминоацилирующаяся рибозимная матрица.

* Адресат для корреспонденции.

т.е. возникновение соответствия между аминокислотами и триплетами нуклеотидов, так и происхождение трансляции, т.е. полимеризации аминокислот на основе закодированной в нуклеиновых кислотах информации, и репликации — воспроизведения генетической информации.

Трансляционная система даже в самых простых современных клетках (например, паразитических и эндосимбиотических бактериях и археях, таких как *Candidatus Carsonella ruddii*, *Mycoplasma* или *Nanoarchaeon*) чрезвычайно сложна [3]. В основе трансляции лежит большой комплекс (рибосома), состоящий по меньшей мере из трёх молекул РНК и 60–80 белков (хотя у облигатных эндосимбионтов может быть меньше 35 рибосомных белков [4]), взаимодействующих с другими компонентами системы трансляции: полным набором тРНК для 20 аминокислот (~40 видов тРНК с учётом присутствия изоакцепторных тРНК у всех видов), 20 аминоксил-тРНК-синтетазами (aaRS), а также же факторами трансляции.

При этом ключевой проблемой в определении того, как возникла современная трансляционная система, является следующий парадокс: высокая точность трансляции вряд ли могла быть достигнута без сложных, высокоразвитых молекул РНК и белков, при этом сложный белковый механизм не мог бы развиваться без точной системы трансляции. Этот парадокс рассматривается в цикле Дарвина–Эйгена (Darwin–Eigen cycle) [3].

ЦИКЛ ДАРВИНА–ЭЙГЕНА

Теория Eigen [5] постулирует существование фундаментального предела, ограничивающего размер генома и точность репликации в самореплицирующихся системах (порог Эйгена): если произведение частоты ошибок и информационной ёмкости системы ниже порога Эйгена, происходит стабильное наследование; если данная величина выше пороговой, мутационный процесс неизбежно приводит к катастрофическому вымиранию системы [5]. Иными словами, уровень ошибок репликационного аппарата лимитирует максимальный размер генома (количество закодированной информации). Для стабильного поддержания репликации, что является необходимым начальным условием биологической эволюции, система обязана непрерывно демонстрировать значения, не выходящие за пределы указанного интервала, в том числе на самых ранних этапах своего существования. Максимальный размер реплицируемой после-

довательности без коррекции ошибок, лимитируемый порогом Эйгена, крайне незначителен. В рамках теории Эйгена увеличение информационной ёмкости и расширение генома могло быть достигнуто благодаря увеличению точности репликации. Однако эволюция высокоточной системы репликации, обеспечивающей коррекцию ошибок, требовала бы значительно большего объёма информации, чем та, которая могла быть закодирована в последовательности самореплицирующейся системы в данный момент эволюционной траектории. Это создаёт, по меньшей мере, видимость парадокса возникновения и эволюции живых систем, описываемого следующим образом: для кодирования древнего механизма репликации была необходима некоторая минимальная сложность генома, в то время как концепция предела ошибок существенно ограничивала его размер. Таким образом, на первый взгляд усложнение генома не представлялось возможным благодаря существованию порога Эйгена [6]. Одним из возможных вариантов разрешения кажущегося парадокса является модель гиперциклов, предложенная Eigen и Schuster [7]. В гиперцикле РНК и ферменты кооперируются следующим образом: РНК I_i кодирует фермент E_i ($i = 1, 2, \dots, n$); ферменты циклически катализируют репликацию РНК таким образом, что E_i катализирует репликацию I_{i+1} , а E_n катализирует репликацию I_1 . Таким образом, в гиперцикле пептиды совместно с РНК формируют целостную систему кооперативно взаимодействующих макромолекул. Согласно данной модели, ферменты могли способствовать повышению точности репликации, в результате чего количество наследуемой информации в примитивной системе возрастало. Модель гиперциклов имеет и недостатки: как было показано в ряде работ [8–10], гиперциклы демонстрируют слабую устойчивость по отношению к мутациям, которые могут приводить к разрушению структуры гиперцикла. Другим потенциальным решением парадокса Эйгена является комбинация естественного отбора и генетического дрейфа. Случайные события рекомбинации или дупликации частей генома, приводящие к умеренному увеличению его размера, могут закрепляться в малых популяциях благодаря генетическому дрейфу. При условии достаточной точности механизма репликации подобные небольшие изменения в размере генома не уменьшают значительным образом приспособленность системы, однако предоставляют генетический материал для эволюции новых адаптивных функций. Среди таких функций могут быть механизмы, повышающие точность репликации, что отодвигает систему от «обрыва

РНК-МИР

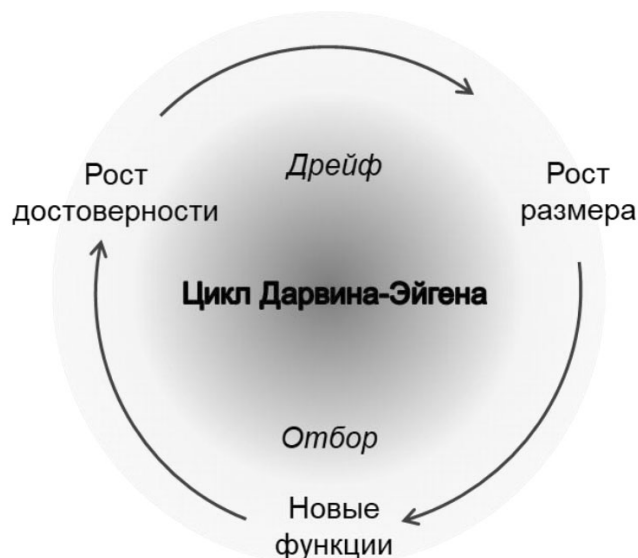


Рис. 1. Цикл Дарвина–Эйгена (Darwin–Eigen cycle). Модифицировано по [3]

Эйгена» и обеспечивает необходимый потенциал к дальнейшему увеличению объёма кодируемой информации. Таким образом, цикл повторяет себя в спиральной прогрессии, приводя к непрерывному увеличению размера генома [6]. Данная система с положительной обратной связью получила название цикла Дарвина–Эйгена [3] (рис. 1).

Основной проблемой рассматриваемой теории остаётся вопрос о первоначальной инициации цикла Дарвина–Эйгена, т.е. как именно была достигнута наименьшая сложность генома, необходимая для приемлемой репликации. Даже в наименее точных современных системах, таких как вириды (точность механизмов репликации составляет всего $\sim 10^{-2}$ [11], т.е. в среднем одна ошибка на 100 нуклеотидов), репликация катализируется сложными белковыми полимеразми, которые, в свою очередь, синтезируются в результате трансляции при участии сложного и многокомпонентного рибосомного аппарата. Koopin и Novozhilov [12] предложили следующее решение кажущегося парадокса первоначальной инициации цикла Дарвина–Эйгена: трансляция в древних самореплицирующихся системах могла обеспечиваться компонентами небелкового происхождения, а инициация цикла произошла в условиях мира РНК. При этом, помимо гипотезы РНК-мира, существуют другие теории, описывающие в качестве родоначальных ДНК, нуклеопротеиды, белки или предполагающие их коэволюцию. Рассмотрим возникновение аппарата трансляции и репликации в рамках этих теорий.

Гипотеза РНК-мира является наиболее широко принятой идеей возникновения жизни на Земле. Rich [13] в 1962 г. впервые предложил наличие энзиматической активности у РНК, затем Crick [14] и Orgel [15] в 1968 г. предположили, что исходной молекулой для возникновения жизни могла являться РНК, а Gilbert [16] ввёл удачный термин «мир РНК» в 1986 г. после того, как была доказана энзиматическая активность РНК [15]. Классическая версия зарождения жизни в рамках РНК-мира заключается в первоначальном синтезе и случайной полимеризации нуклеотидов, которые привели к образованию пулов олигомеров реплицирующихся нуклеиновых кислот; рекомбинационные события привели к образованию более длинных олигомеров, которые складывались в структуры различной сложности и образовывали ферментативно активные рибозимы. По мере увеличения сложности полинуклеотидов возникали первые РНК-репликазы, образовывались оболочки, и это привело к появлению протоклеток со способностью к эволюции [17].

Свидетельством в пользу РНК-мира стало открытие разнообразных рибозимов, которые могли осуществлять всю основную «работу» на заре зарождения жизни [18–21]. Обнаруженные рибозимные активности могли бы свидетельствовать о том, что именно РНК играли роль биологических катализаторов в рамках гипотезы РНК-мира. И несмотря на то что природные РНК-репликазы до сих пор не были найдены, существуют искусственно созданные рибозимы со свойствами РНК-полимеразы дистрибутивного типа [22, 23].

Известно, что самыми консервативными существующими генами являются гены трансляции [24]. Рибосомные белки, тРНК и aaRS, а также белковые факторы, которые участвуют в инициации, элонгации и терминации, обладают удивительно консервативными структурами и универсальны для всех видов [25, 26]. Общая коровая рРНК, которая является главным функциональным компонентом рибосомы, консервативна на протяжении всей филогенетической истории [27, 28], при этом сохраняется как последовательность, так и вторичная, и третичная структуры [24].

При этом в теории РНК-мира есть ряд нерешённых проблем [29–31]. Так, аргументом против теории является то, что РНК слишком сложна, чтобы возникать *de novo* в пребиотической среде. В частности, есть сложности с абиотическим синтезом пиримидиновых рибонуклеотидов [30, 32, 33], нестабильностью молекул РНК

и их высокой чувствительностью к рН и наличию ионов магния [29]. Кроме того, для существования и эволюции РНК-мира существует ряд ограничений по физическим условиям: необходимо наличие РНК-адсорбирующих поверхностей, регулярных циклов подсушивания/увлажнения, нагревания/охлаждения, замораживания/оттаивания, а также механизмов защиты РНК от космического излучения [34]. Существует и проблема хиральности при репликации РНК [35]. Нуклеотиды и их предшественники в пребиотическом мире существовали, вероятно, как рацемическая смесь право- и левовращающих молекул, и включение противоположно вращающего нуклеотида в цепь нарушало бы репликацию.

Надёжность репликации является ещё одной проблемой РНК-мира: поскольку точность самосборки РНК низкая, количество ошибок увеличивается по мере удлинения цепей, и циклы повторяются. Накопление ошибочных молекул в конечном итоге могло бы привести к гибели всей системы [30]. Большой проблемой является также низкая процессивность предполагаемой древней репликации молекул РНК. Кроме того, при рассмотрении самопроизвольной репликации матриц скорость их образования сопоставима со скоростью их деградации [36]. Часть парадоксов, связанных с накоплением ошибок, может быть разрешена, если предположить, что РНКовая РНК-полимераза состояла из нескольких частей, каждая из которых относительно короткая, а сборка осуществлялась за счёт спаривания. Это могло бы повысить вероятность безошибочной репликации фрагментов, а значит и образования полноценных комплексов и, по-видимому, могло сделать более эффективным отбор. Однако подобные полимеразы не были обнаружены или получены экспериментально.

Появление смысловых цепочек большого размера также сложно объяснить в рамках РНК-мира [30]. Этот момент можно проиллюстрировать на примере случайного происхождения рибозимной РНК-полимеразы: появление нескольких РНК-полимеразных рибозимов потенциально возможно, однако они будут занимать лишь незначительную долю от огромного количества вероятных последовательностей РНК [36]. Таким образом, формирование значимых функциональных полинуклеотидов случайным образом кажется маловероятным [30].

Кроме того, катализ является относительно редким свойством РНК, а также РНК имеет слишком ограниченный каталитический репертуар [29]. Несмотря на достижения в области пребиотической химии, до сих пор не удалось

продемонстрировать надёжную и непрерывную саморепликацию РНК из исходных молекул. Изолированная РНК может оказаться недостаточным условием для того, чтобы катализировать собственную репликацию, и может нуждаться в наличии либо других молекул, либо определённых условий окружающей среды [11].

Тем не менее теория РНК-мира является наиболее принятой гипотезой, в рамках которой предложены различные модели эволюции ключевых компонентов репликации и трансляции: возникновения генетического кода, образования молекул мРНК, тРНК, aaRS, рибосом, а также самого механизма репликации РНК.

Происхождение репликации в рамках гипотезы РНК-мира. Неферментативная матричная полимеризация нуклеотидов. Согласно гипотезам неферментативной репликации, удвоение молекулы РНК могло проходить с помощью дотраивания праймера активированными (например, имидазолом) мономерами [37, 38] или олигомерами [39]. Механизм, использующий активированные мономеры, имеет много общего с современными универсальными биологическими процессами ферментативной репликации РНК и ДНК. Экспериментально показано, что скорость присоединения активированных мономеров к праймеру значительно выше, чем лигирование праймера к олигонуклеотиду [40]. При этом олигонуклеотиды могут долгое время находиться на матрице, и низкая скорость лигирования в таком случае не будет проблемой. Считается, что эффективное копирование длинных матриц РНК может быть достигнуто за счёт гибридного процесса, в котором олигонуклеотиды выступают в роли праймеров на нескольких сайтах на матрице, а присоединяющиеся мономеры дотраивают места пробелов, после чего происходит лигирование всех фрагментов [38, 41]. При этом при рассмотрении неферментативной репликации необходимо отметить, что при таком механизме могут образовываться не только правильные связи между нуклеотидами (3'–5'), но и связи между «неправильными» гидроксилами рибозы (2'–5'). Кроме того, низкая скорость такой репликации сопоставима со скоростью деградации синтезированной РНК, что накладывает значительное количество ограничений на эту концепцию.

РНК-катализируемая репликация. Концепция РНК-мира подразумевает существование рибозима, обладающего свойствами РНК-зависимой РНК-полимеразы, которая синтезировала бы комплементарные РНК для воспроизводства дополнительных копий самой себя. Образование способной к такой активности молекулы РНК могло происходить по следующему сценар

рию: благодаря неферментативной репликации образовывались популяции реплицирующихся РНК. Среди них некоторые РНК получили бы большее распространение в случае, если бы они обладали более высокой скоростью воспроизводства. Таким образом, мог произойти отбор наиболее подходящих матричных последовательностей и РНК, способствующих увеличению эффективности процесса репликации. При продолжающемся селективном давлении этот процесс химической репликации будет вытеснен биохимическим процессом репликации [38].

Возможность существования рибозимной РНК-полимеразы была показана в работе Bartell и Szostak [42], которые *in vitro* воспроизвели эволюцию большой популяции РНК со случайными последовательностями и в результате отобрали рибозим РНК-лигазы размером ~100 нуклеотидов, катализирующий соединение двух связанных с матрицей олигонуклеотидов [38]. Далее была проведена серия экспериментов по эволюции *in vitro* для преобразования этой лигазы в настоящую РНК-полимеразу, которая действует на отдельной матрице РНК. В результате дальнейшей оптимизации рибозимной полимеразы была увеличена длина синтезируемого фрагмента, скорость полимеризации, эффективность работы на сложных матрицах и точность рибозима [38]. Полученный в итоге полимеразный рибозим был способен достаточно быстро синтезировать множество сложноструктурированных РНК [43]. Таким образом, эта оптимизированная РНК-полимераза могла катализировать реципрокный синтез как РНК, так и её комплементарной цепи, обеспечивая экспоненциальную амплификацию коротких матриц РНК в форме полимеразной цепной реакции, и кроме того, была способна синтезировать полимеры ДНК на матрице РНК [44]. Несмотря на то что наиболее оптимизированная форма такой полимеразы не может реплицировать длинные последовательности РНК, исследователи данного направления эволюции репликации Joyce и Szostak полагают, что в конечном итоге в лаборатории будет разработана процессивная РНК-репликаза (молекулярная машина, которая продвигается по полинуклеотидной матрице и включает мономеры в растущую комплементарную цепь) [38].

Происхождение генетического кода в рамках гипотезы мира РНК. Генетический код представляет собой систему, определяющую трансляцию нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот в аминокислотную последовательность полипептидов, и является практически универсальной системой живых организмов [12, 45]. За расшифровку генетического ко-

да Khorana и Nirenberg вместе с Holley в 1968 г. получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине. С момента завершения процесса расшифровки стандартного генетического кода, в котором приняли участие несколько исследовательских групп [46–49], множество исследователей вовлечены в изучение его структуры и свойств. Существует несколько теорий происхождения этой системы строгого соответствия кодируемых аминокислот триплетам нуклеотидов, которые не являются взаимоисключающими, а, вероятно, описывают разные этапы формирования структуры генетического кода.

Стереохимическая гипотеза. Согласно стереохимической теории, генетический код должен был возникнуть благодаря физико-химическим взаимодействиям между нуклеотидами антикодонов или кодонов и соответствующими аминокислотами.

Для экспериментальной проверки гипотезы стереохимического взаимодействия была разработана специальная шкала (англ. Polar Requirement, PR), отражающая растворимость аминокислот в пиридине и его производных (аналогах пиримидина) [50]. Используя эту шкалу, Woese [51] показал, что аминокислоты со схожими значениями PR, как правило, кодируются родственными кодонами, обычно — кодонами с одинаковым вторым основанием [50, 51]. С развитием технологий получения аптамеров возникли новые аргументы в поддержку стереохимической теории. В экспериментах SELEX было показано, что фракции случайных аптамеров РНК, отобранных на основе их способности связываться с определенными аминокислотными остатками, значительно обогащены соответствующими триплетами. Критика экспериментов SELEX обычно связана с тем, что специфические статистически значимые корреляции были обнаружены для незначительного количества аминокислот, при этом в некоторых случаях последовательности были обогащены кодонами, а в других — антикодонами [51–55]. Кроме того, сродство было показано для аминокислот, большинство из которых имело сложное строение и которые могли быть недоступны для формирования структуры генетического кода на ранних этапах его эволюции [12, 45, 56].

В серии недавно опубликованных протеомных исследований было установлено, что профили распределения плотности пиримидина в последовательностях мРНК коррелируют с профилями распределения значений PR, кодируемых белков. Иными словами, участки мРНК, богатые пиримидинами, кодируют участки белка, которые проявляют высокую склонность к взаимодействию с миметиками пиримидина, и

наоборот [51, 57–60]. Неясно, однако, могли ли предполагаемые стереохимические взаимодействия между нуклеиновыми кислотами и пептидами, а не свободными аминокислотами, играть значимую роль в происхождении кода [12].

Для объяснения наблюдаемых корреляций в рамках стереохимической гипотезы различными авторами было предложено множество моделей стереохимического взаимодействия между аминокислотами и нуклеотидами нуклеиновых кислот [61–65]. Следует отметить, что только некоторые из предложенных механизмов (например, предложенный Woese et al. [50]) потенциально способны объяснить процесс прямого формирования полипептидной цепи на матрице нуклеотидной последовательности, так как для возникновения пептидной связи было необходимо в первую очередь обеспечить сближение аминокислот в пространстве. Существенная разница в размерах между нуклеотидными триплетами и аминокислотами затрудняет пространственное сближение аминокислот в процессе прямого матричного синтеза. Тем не менее, несмотря на свои недостатки, стереохимическая гипотеза может значительно облегчить понимание того, как происходило формирование и ранняя эволюция генетического кода [56].

Гипотеза расширения кода. Сценарий эволюции кода, предложенный ещё Crick [14], включал примитивную легко реплицирующуюся нуклеиновую кислоту, несколько наиболее доступных аминокислот и первичный код, базирующийся на двух основаниях. Crick полагал, что двух оснований могло быть достаточно для кодирования ограниченного репертуара аминокислот в составе примитивных белков. При этом кодон должен был оставаться триплетным на протяжении всей эволюции генетического кода, так как нарушение принципа непрерывности кода с высокой вероятностью оказалось бы летальным даже для примитивного организма. Woese et al. [50], основываясь на паттернах кластеризации аминокислот, наблюдаемых в структуре стандартного генетического кода, выдвинул гипотезу о том, что примитивный код мог обладать низкой специфичностью: отдельные триплеты кодировали группы химически родственных аминокислот, при этом система распознавания базировалась на одном основании. Таким образом, примитивный код, вероятно, обладал гораздо более высокой степенью вырожденности и характеризовался относительно низким потенциалом кодирования. Данные представления были развиты в модели «2-1-3» [66], которая предлагала сценарий расширения генетического кода и увеличения его разрешаю-

щей способности путём последовательного назначения специфичности второму, затем первому и, в некоторых случаях, третьему нуклеотиду кодона.

Метаболическая теория. Теория коэволюции (метаболическая теория) Wong [67, 68] утверждает, что структура стандартного кода отражает пути биосинтеза аминокислот. Он разделил все протеиногенные аминокислоты на аминокислоты пребиотического происхождения — аминокислоты Фазы 1 (Gly, Ala, Ser, Asp, Glu, Val, Leu, Ile, Pro и Thr) и аминокислоты, возникшие в результате биосинтеза из пребиотических — аминокислоты Фазы 2 (Phe, Tyr, Arg, His, Trp, Asn, Gln, Lys, Cys и Met) [67, 68]. Основываясь на существующих представлениях о биосинтезе аминокислот, Wong предложил следующую схему эволюции биохимических путей синтеза аминокислот Фазы 2 из путей синтеза их предшественников, т.е. аминокислот Фазы 1: Ser — Trp, Ser — Cys, Val — Leu, Thr — Ile, Gln — His, Phe — Tyr, Glu — Gln и Asp — Asn [68]. По его предположению, возникающая в системе генетического кода аминокислота наследовала кодон своего предшественника. Критика теории коэволюции «код-путь» Wong отражена в работах Amirnovin [69] и Ronneberger et al. [70].

Теория «замороженной случайности». Согласно современным представлениям, расширение системы генетического кода по описанному выше сценарию было возможно только в случае кодирования незначительного количества белков, характеризующихся относительно простой структурой. По мере эволюционного развития организмов усложнялись как структура и специфичность функций кодируемых белков, так и их репертуар. В конечном итоге должен был наступить момент, когда любое незначительное изменение в существующей системе кодирования и введение новой аминокислоты приводило бы к критическому нарушению первичной структуры значимого количества кодируемых белков [14]. Таким образом, наблюдаемая высокая консервативность структуры генетического кода обусловлена давлением отрицательного отбора, сила которого увеличивалась по мере усложнения системы [14, 45]. Соответственно, в какой-то момент код перестал накапливать изменения, и, обсуждая эту проблему, Crick [14] предложил термин «замороженной случайности» (англ. «frozen accident»).

Теория минимизации ошибок. Crick [14] и Woese [71] полагали, что формирование наблюдаемой структуры стандартного генетического кода происходило случайным образом и не включало какие-либо механизмы оптимизации. Однако это плохо согласуется с тем фактом, что

стандартный генетический код характеризуется высокой степенью устойчивости к ошибкам (в частности, синонимичные замены, как правило, не приводят к нарушению структуры кодируемого белка; кроме того, замена первого нуклеотида в кодоне часто приводит к включению аминокислоты со схожими физико-химическими свойствами). Устойчивость кода к ошибкам была подтверждена в многочисленных экспериментах *in silico* [56, 72, 73]. Было показано, например, что вероятность достичь аналогичного уровня минимизации ошибок путём случайных перестановок кодонов стандартного генетического кода составляет менее 10^{-6} [56]. Высокая устойчивость стандартного генетического кода к трансляционным ошибкам стала главным аргументом в пользу теории формирования кода под давлением естественного отбора. Теория получила название теории минимизации ошибок [12, 45]. В исследовании адаптивного ландшафта генетического кода авторы изучили возможную эволюцию устойчивости генетического кода к трансляционным ошибкам и подтвердили гипотезу о том, что эволюция стандартного генетического кода могла включать в себя стадию его частичной оптимизации с целью минимизировать эффект мутаций, возникающих в процессе трансляции [73].

Таким образом, сценарий возникновения современной системы кодирования, называемой стандартным генетическим кодом, мог включать следующие стадии: на этапе, когда пул протеиногенных аминокислот характеризовался невысоким разнообразием, назначение кодонов могло определяться одним или двумя нуклеотидами, согласно стереохимическим взаимодействиям; затем по мере увеличения доступности аминокислот эволюция происходила по пути расширения кода и увеличения специфичности кодирования, при этом биохимически родственные аминокислоты кодировались родственными кодонами; по мере усложнения кодируемых белков код был оптимизирован таким образом, чтобы минимизировать возможные ошибки трансляции; и, в конце концов, когда любые изменения в системе устоявшегося соответствия аминокислот кодонам могли стать летальными для организма, код был «заморожен» в его локальном состоянии, а его дальнейшая эволюция стала невозможной за редкими исключениями, что обеспечило наблюдаемую универсальность генетического кода. На сегодняшний день быстроразвивающаяся синтетическая биология уже обладает инструментами и технологиями, которые позволяют модифицировать стандартный генетический код [74]. Дальнейшие исследования в этой области помо-

гут углубить наше понимание механизмов эволюции канонического кода.

Возникновение разнообразия молекул РНК. Молекулы РНК являются центральным звеном процесса передачи информации от генов к белкам (мРНК), функционирования самого механизма трансляции (рРНК и тРНК) и осуществления различных регуляторных функций (различные классы некодирующих РНК). Для формирования современной трансляторной системы в процессе эволюции должны были возникнуть предшественники этих молекул. Так, в ряде гипотез предлагаются модели последовательных преобразований молекул РНК, в ходе которых сформировались структуры, выполняющие функции мРНК, тРНК и рибосом.

Теория рекомбинирующихся РНК. В рамках РНК-мира существует гипотеза, выдвинутая Спириным [75], в которой предполагается, что первичный трансляционный аппарат возник до появления аппарата энзиматической репликации генетического материала и базировался на нескольких видах специализированных РНК. Согласно этой гипотезе, многообразие молекул РНК, в том числе молекул с рибозимной активностью, достигалось благодаря рекомбинации вследствие спонтанной неэнзиматической трансэстерификации абиогенно синтезированных олигорибонуклеотидов. Благодаря такой рекомбинации коротких молекул РНК, комплементарно связывающихся с полинуклеотидной матрицей, происходило объединение фрагментов и первичное размножение молекул РНК. А с появлением рибозимов с полимеразной активностью эффективность репликации должна была значительно возрастать [75, 76]. Согласно данной гипотезе, рекомбинация молекул РНК приводила к образованию первичного трансляционного аппарата: прото-мРНК, набора прото-тРНК, каталитически активной проторибосомной РНК с пептидилтрансферазной активностью и проторибосомной РНК, способной взаимодействовать одновременно с каталитической проторибосомной РНК, прото-мРНК и прото-тРНК. Эта система уже могла осуществлять первичную трансляцию [75]. В дальнейшем эта гипотеза развилась в предположение, что только рекомбинаций полирибонуклеотидов недостаточно для появления и эволюции каталитических РНК, и сначала должны возникнуть нуклеозидтрифосфатзависимые хеликазы на основе РНК [76]. Такие рибозимные хеликазы могли быть способны раскручивать стабильные двухспиральные РНК, неизбежно образующиеся в процессе синтеза РНК на комплементарных матрицах. Благодаря этому мог возникнуть механизм репликации РНК с использова-

нием двухспиральных РНК, что положило начало быстрой эволюции древнего мира РНК [76]. Можно предположить, что образующиеся пептиды, не так уж и необходимые для такого мира рекомбинирующихся РНК, могли стабилизировать РНК, защищая от гидролиза и потери правильной пространственной структуры [77].

Теория прямого кодирования РНК-матрицей.

Самый простой способ кодирования пептидов по шаблону РНК заключается в непосредственном последовательном связывании активированных аминокислот на матрице РНК. Такой механизм предложен Yarus et al. [52, 53] в теории прямого кодирования РНК (англ. Direct RNA Template, DRT) и основан на стереохимической гипотезе возникновения генетического кода. Согласно этой модели, активированные аминокислоты непосредственно связывались непосредственно с РНК-матрицей (рис. 2, а). Взаимодействие аминокислоты при этом могло быть как с последовательностью кодона, так и с последовательностью антикодона. Матрица РНК представляла собой аптамероподобные структуры, распознающие активированные аминокислоты (рис. 2, а; б, часть 1). Стереохимическое взаимодействие определённых аминокислот с матрицей РНК сопровождалось образованием пептидной связи либо химическим, либо рибозим-опосредованным катализом, который осуществлялся или за счёт активности самой матрицы DRT, или реализовывался сторонним рибозимом [58]. Так, активированные аминокислоты полимеризовались, и формировался кодируемый DRT-пептид. На следующем этапе система DRT могла эволюционировать в сторону современного непрямого кодирования, использующего промежуточное звено — тРНК. Такая промежуточная аминоацил-РНК образовывалась через присоединение антикодонного фрагмента DRT к активированной рибозой группе аминокислоты (рис. 2, б, часть 2). Таким образом, происходило преобразование исходной функции связывания аминокислоты в функцию кодирования нуклеиновой кислоты [55]. На более позднем этапе произошёл переход к единой образной версии непрямого кодирования (рис. 2, б, часть 3), включающего отдельную мРНК, активированные аминокислоты, связанные с их антикодонами (аминоацил-тРНК), а также РНК с пептидилтрансферазной активностью — риборибосому [52, 78].

Основная проблема гипотезы прямого кодирования аминокислот с РНК-матрицы — это выраженное пространственное несоответствие размеров аминокислот и нуклеотидных триплетов (рис. 2, в). Такое положение дел оставляет только один возможный вариант последова-

тельного прямого кодирования — спиралевидное закручивание нуклеотидной нити вокруг аминокислотной. Однако в этом случае могли бы возникать различные межнуклеотидные взаимодействия, которые многократно повышали бы вероятность образования РНКовых шпилек и подобных структур. Большим вопросом остаётся и процесс извлечения пептидного стержня из РНКовой спирали. Единственное решение такой проблемы — непоследовательное кодирование аминокислот, т.е. расположение кодирующих триплетов не подряд (рис. 2, а). Переход же к сплошному кодированию мог произойти только после подключения тРНК к процессу трансляции.

Идея напрямую кодирующей РНК была развита также в работе Ма [80] в гипотезу возникновения механизма трансляции DRT с учётом принципа репликативной экономии (англ. Direct RNA Template with replication parsimony). Под «репликативной экономией» в данной гипотезе подразумевается тот факт, что под давлением отбора из-за сложности репликации существовала тенденция к «скупому», «экономному» использованию генетического материала, поэтому на ранних этапах не могли возникнуть сложные, но «бессмысленные» в данный момент структуры, которые потом обрели бы функциональность. Данная гипотеза DRT с учётом принципа репликативной экономии пытается последовательно объяснить эволюционные события появления таких промежуточных звеньев, как тРНК, мРНК или рРНК [80].

Гипотеза подразумевает, что из-за нестабильности РНК некоторые молекулы DRT могли деградировать или быть недореплицированными из-за низкой эффективности рибозимных РНК-полимераз. Эти события могли привести к образованию фрагментов, содержащих основной домен аминокислотного аптамера, окружённого последовательностями спейсеров. При этом полная репликация DRT производила цепи, комплементарные DRT — C-DRT (рис 3, а). Фрагменты DRT «распознавали» C-DRT согласно принципу комплементарности. Аптамерная область фрагментов трансформировалась в конформацию с большой «петлёй распознавания», и они могли превратиться в адаптеры, использующие C-DRT в качестве матрицы (рис. 3, б). При этом самоаминоацилирование могло происходить благодаря рибозимной активности при условии, что фрагмент РНК содержал сайт связывания аминокислоты и один из концов цепи находился вблизи сайта связывания аминокислоты. Это могло быть возможным при формировании L-образной тРНК-подобной структуры, т.е. прото-тРНК, имеющей

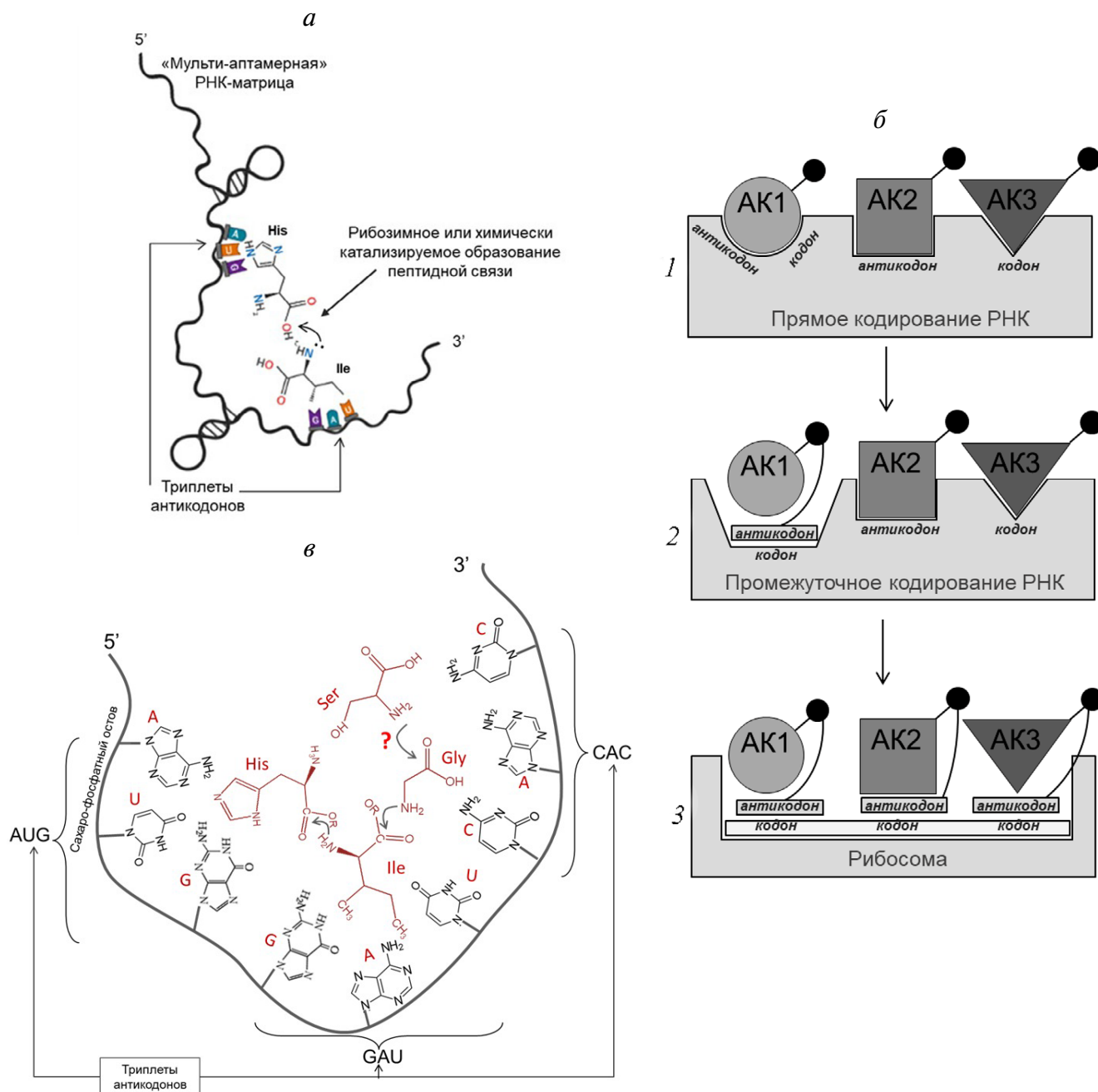


Рис. 2. Модель прямого кодирования на матрице РНК (англ. Direct RNA Template, DRT). *а* – Схематическое изображение матрицы DRT на примере фрагмента РНК, непоследовательно связывающего гистидин и изолейцин. Модифицировано по [79]. *б*, часть 1 – Первичная трансляция, при которой активированные аминокислоты связываются для полимеризации с сайтами (кодонами или антикодонами) на матрице РНК (DRT). Активирующие карбоксильные группы (*) участвуют в полимеризации аминокислот с получением закодированного пептида. *б*, часть 2 – Промежуточное кодирование РНК. Образуется аминокислота-РНК (подобие тРНК) путём объединения антикодона кодирующей РНК с аминокислотой. *б*, часть 3 – Переход к единой версии современного непрямого кодирования: появление отдельной прото-мРНК, примитивных аминокислот-тРНК, состоящих из активированных форм аминокислот, связанных с их антикодонами, и рибосомы. Модифицировано по [52, 53]. *в* – Пространственное несоответствие триплетов и аминокислот. При прямом сплошном кодировании аминокислоты либо «не дотягиваются» друг до друга, либо РНКовая нить закручивается, формируя кольца или спирали

«ногу», вертикально связывающуюся с С-DRT, и «руку», горизонтально доставляющую аминокислоты. Прото-мРНК могла бы возникнуть в результате утраты спейсерных последователь-

ностей С-DRT, находящихся между прото-тРНК-связывающими сайтами (рис. 3, *в*) [80]. Возникшая прото-тРНК распознавала прото-мРНК за счёт связывания довольно большого

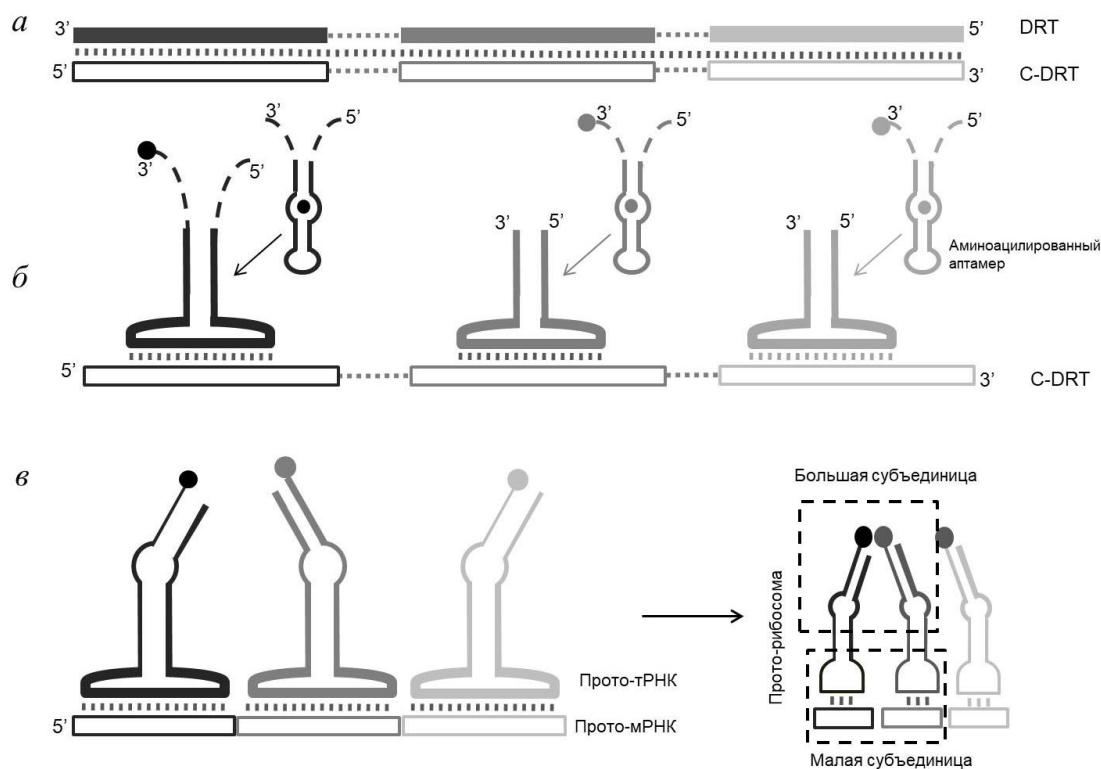


Рис. 3. Модель прямого кодирования на матрице РНК с учётом принципа репликативной экономии (англ. Direct RNA Template with replication parsimony). *а* – Репликация DRT приводит к образованию комплементарной цепи – C-DRT. *б* – В результате деградации или неполной репликации DRT могут образоваться сегменты с аминоксил-аптамерным доменом, фланкированным некоторыми спейсерными последовательностями. Они могут трансформироваться в конформацию с большой «петлёр распознавания», и, таким образом, возникают адаптеры, использующие C-DRT в качестве матрицы. *в* – Возникновение мРНК: C-DRT теряет последовательности между сайтами связывания аминоксил-аптамера, появление малой субъединицы прото-рРНК способствует стабилизации кодон-антикодонного взаимодействия триплетных пар прото-тРНК и прото-мРНК. Появление большой субъединицы прото-рРНК способствует сближению аминокислот, что приводит к образованию пептидных связей. Модифицировано по [80]

количества нуклеотидных остатков, в результате чего образовывался стабильный комплекс. При сокращении количества «антикодонных» оснований до трёх ослаблялось связывание между заряженной аминокислотой прото-тРНК и прото-мРНК, при этом появление малой субъединицы прото-рРНК могло обеспечить большую стабильность комплекса. Большая субъединица прото-рибосомы возникала в рамках этой гипотезы для обеспечения эффективности реакции пептидилпереноса и удерживала заряженные аминокислоты рядом друг с другом, работая как рибозим, таким же образом, как и большая субъединица рРНК в современной рибосоме [80].

Возникновение тРНК. Современные транспортные РНК состоят в среднем из 76 нуклеотидов (73–93), обладают универсальной последовательностью ССА на 3'-конце и вторичной структурой клеверного листа. Вторичная структура клеверного листа молекулы тРНК складывается в L-образную трёхмерную конформацию

посредством сложных третичных взаимодействий, в том числе между D- и T-плечами, образованными акцепторным стержнем плюс T-стержнем с T-петлёр и D-стержнем с D-петлёр вместе с антикодонным стержнем и петлёр. Небольшой размер молекулы тРНК делает её привлекательным кандидатом на роль первого возникшего компонента генетической системы. Это предположение основывается на том, что до возникновения гиперциклической самовоспроизводящейся системы (см. гиперцикл Eigen–Schuster [7]) длина нуклеотидных цепей, которые могли быть точно реплицированы при дарвиновском отборе, составляла не более 100 нуклеотидов, что сопоставимо с размером молекулы тРНК.

В процессе выявления возможного механизма возникновения тРНК, проанализировав более тысячи последовательностей тРНК, Rodin et al. [81] реконструировали консенсусную структуру акцепторных доменов тРНК. Консенсусная последовательность представляла

собой двухцепочечный палиндром длиной 11 нуклеотидов с комплементарными триплетами в центре, каждый из которых был окружен мотивами 3'-ACCD и NGGU-5' на каждой нити, где D — это дискриминаторное основание. Такой палиндром мог реплицироваться в аналогичный палиндром длиной 25 пар нуклеотидов с комплементарным триплетом в середине, и далее самопроизвольная элонгация обоих палиндромов должна была привести к образованию двух спиралей с внутренними комплементарными триплетами. Наконец, удаление 5'-UGGN с 5'-конца привело к образованию современного тРНК-подобного клеверного листа (рис. 4, а). В исследовании Rodin et al. [81] также была обнаружена следующая закономерность: в парах тРНК с комплементарными антикодонами их основания во второй позиции акцепторного ствола также были комплементарными. За единственным исключением (пара тРНК-Phe/тРНК-Glu), такой параллелизм особенно впечатляет для пар тРНК, распознаваемых аминоксил-тРНК-синтетазами (aaRS) из противоположных классов.

Возможным доказательством того, что тРНК возникла путём лигирования двух шпильчатых молекул РНК, является следующее наблюдение. Число возможных последовательностей РНК, состоящих из четырёх нуклеотидных оснований, равно 4^n (где n — число нуклеотидов). По математической оценке Tamura [82], не учитывая функциональную частоту, общая масса, необходимая для образования нуклеотидной цепи длиной, аналогичной современной тРНК (~76 нуклеотидов), составила бы ~1/25 от общей массы Земли. Однако для полу-тРНК (~35 нуклеотидов) требуемая масса составляла бы не более 100 г, что говорит о вероятности образования современных тРНК путём, похожим на шпильки [82]. Анализ, проведённый в ряде работ, ука-

зывает на то, что большинство последовательностей тРНК возникли в результате двойной дупликации шпильки [83, 84]. Комплементарное спаривание между нуклеотидами акцепторного ствола и основаниями антикодонных ствола/петли в 5'-половине тРНК и 3'-половине тРНК соответствует двойному складыванию шпильки (рис. 4, б). Таким образом, это может свидетельствовать о том, что образование двойной шпильки в древнем пребиотическом мире лежит в основе эволюции современной структуры тРНК [82].

Возникновение рРНК. Существует предположение, также основанное на моделях объединения фрагментов молекул тРНК, которое описывает эволюцию рибосом путём слияния (аккреции) тРНК-подобных РНК [85–88]. Димерная центральная часть рибосомной РНК вокруг пептидилтрансферазного центра сходна с димерами тРНК, связанными комплементарными антикодонами. Отметим, что в современных митохондриальных рибосомах позвоночных регулярные митохондриальные тРНК конститутивно выполняют функции 5S рРНК [89], что может свидетельствовать в пользу такого сценария эволюции рРНК. Кластеризация вторичных структур РНК [90] обнаружила две основные группы вторичных структур РНК, одна из которых характеризуется небольшими, предположительно, древними тРНК-подобными вторичными структурами, и предполагаемая более поздняя группа, состоящая из более крупных рРНК-подобных вторичных структур.

Существует так называемая аккреционная модель эволюции рибосомы, основанная на исследовании тРНК-рРНК-эволюционной оси [87]. Модель предполагает возникновение предковых сегментов РНК и их объединение в структуры большой и малой прото-рРНК. Авторы аккреционной модели делят эволюцию системы

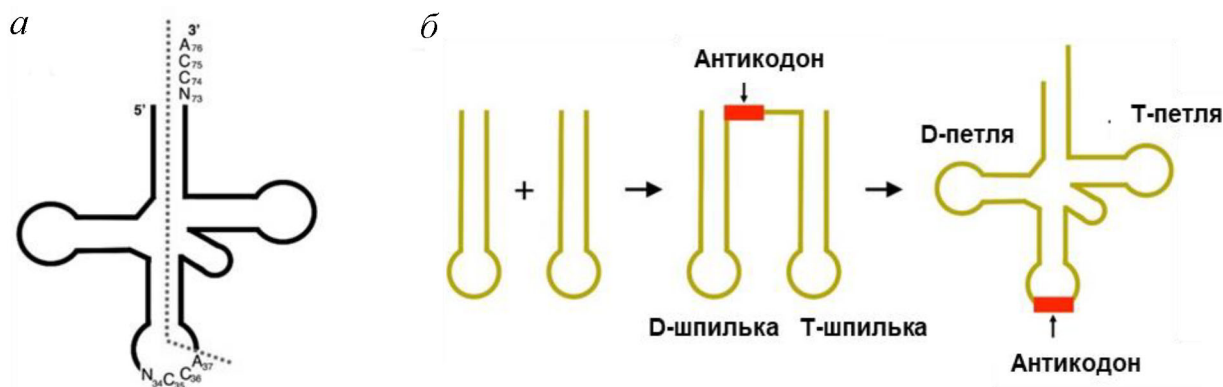


Рис. 4. Образование молекулы тРНК путём лигирования двух олигомерных молекул на примере глициновой тРНК (а). Модель образования тРНК из двух шпильчатых структур (б). Модифицировано по [82]

трансляции на шесть фаз (рис. 5). В первой фазе формировались шпильчатые структуры РНК, содержащие ССА-последовательность на 3'-конце и стабилизовавшиеся взаимодействиями с катионами металлов. Они служили мономерами как для будущих прото-тРНК, так и прото-рРНК. Во второй фазе шпильчатые фрагменты неспецифически объединялись в олигомеры будущей большой прото-рРНК и малой прото-рРНК. Большая прото-рРНК могла представлять собой рибозим с пептидилтрансферазным центром, катализирующим неспецифическую полимеризацию аминокислот. Шпильчатые структуры с заряженными аминокислотами ССА-хвостами могли доставлять аминокислоты в пептидилтрансферазный центр прото-рРНК. Функция малой прото-рРНК могла заключаться в формировании ассоциации с одноцепочечной РНК (прото-мРНК). В третьей фазе происходило объединение шпильчатых структур прото-тРНК в современную L-структуру тРНК. Загорающаяся ассоциация между субъединицами прото-рРНК опосредовалась прото-мРНК и тРНК. Малая прото-рРНК и прото-мРНК рекрутировались сформировавшейся тРНК: тРНК на одном конце связывалась с пептидилтрансферазным центром большой прото-рРНК, а на другом – с прото-мРНК, которая, в свою очередь, связывалась с одноцепочечной областью малой прото-рРНК. В четвертой фазе происходило дальнейшее объединение шпильчатых структур субъединиц прото-рРНК, сформировались А- и Р-сайты, большая прото-рРНК неcodируемо полимеризовала аминокислоты, а прото-мРНК и малая прото-рРНК действовали как кофакторы, позиционирующие тРНК в А- и

Р-сайты рибозима. В пятой фазе рибосома приобрела примитивную способность к декодированию, стала энергозависимой и транслоцирующей, возник механизм храповика. Шестая фаза знаменует завершение формирования общего ядра рРНК, взаимодействий с рибосомными белками и оптимизацию генетического кода. Переход от синтеза неcodированных гетерогенных аминокислотных олигомеров к белкам с помощью рибосомы давал преимущества, поскольку некоторые продукты реакции связывались с рибосомой. Таким образом, рибосома последовательно приобретала способность к структурированию РНК, катализу, ассоциации субъединиц, коэволюции субъединиц, декодированию и передаче энергии и породила существующие симбиотические отношения белка и нуклеиновой кислоты [87].

Гипотеза de Farias et al. [91] подчёркивает центральную роль молекул тРНК в возникновении и развитии матричных процессов. Согласно этой гипотезе, тРНК дали начало первым генам (мРНК) и пептидилтрансферазному центру рибосомы (рРНК). Эволюционные превращения генетической системы в рамках этой гипотезы отражены на рис. 5. Первые гены образовались из тРНК путём структурных изменений (структура тРНК-подобной мРНК) и связывали другие тРНК (каноническая структура тРНК клеверного листа) с помощью петли прото-антикодона. Аминокислоты и небольшие пептиды при этом работали подобно кофакторам, стабилизируя альтернативные конформации прото-тРНК. Связывание двух или более тРНК повышало стабильность этих молекул. Связывающиеся с аминокислотами тРНК могли взаимодей-

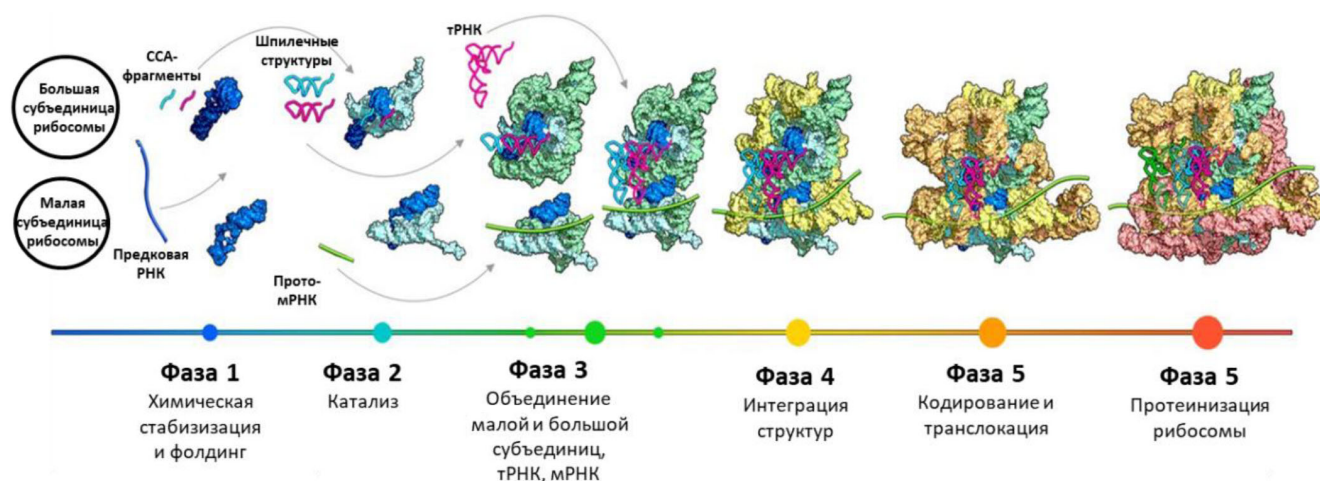


Рис. 5. Шесть фаз аккреционной модели эволюции рибосом. По работе Petrov, A. S., et al. (2015) History of the ribosome and the origin of translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 15396-15401, doi: 10.1073/pnas.1509761112 [87]. (PNAS не несёт ответственность за точность перевода.)

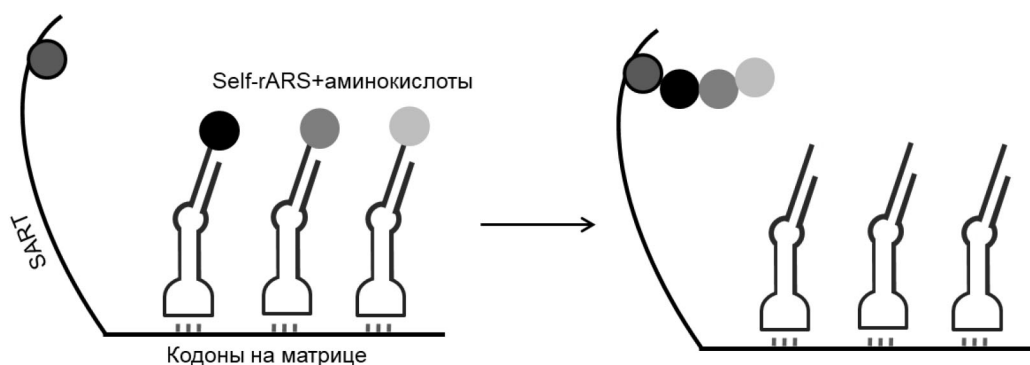


Рис. 6. Модель самоаминоацилирующих рибозимных матриц (англ. Self-rARS Template, SART). Синтез боковой цепи из трёх аминокислот на нуклеотиде-мишени X (темно-серый круг) из конъюгатов аминокислота-Self-rARS, связанных со специфичными аминокислотам кодонными сайтами на матрице SART. Модифицировано по [94]

ствовать с другими тРНК в открытой конформации (тРНК-подобная структура мРНК). Это взаимодействие стабилизировало сложную клеверную тРНК-каноническую структуру. Кроме того, образование комплекса прото-тРНК/мРНК стабилизировало взаимодействие с прото-рРНК (прото-пептидилтрансферазный центр), образуя тройную структуру прото-тРНК/мРНК/рРНК [91]. Предполагается, что первые пептиды, которые были зафиксированы в биологической системе, обладали способностью связывать и стабилизировать тРНК в различных структурных конформациях, что, в свою очередь, увеличивало стабильность и эффективность процесса, тем самым устанавливая первую положительную обратную связь между пептидами и нуклеиновыми кислотами [92]. С увеличением стабильности системы синтеза примитивного белка её эффективность возросла, а скорость включения аминокислот в образующиеся прото-белки увеличилась [91].

Возникновение аминокислотирования РНК. Гипотеза самоаминоацилирующих рибозимных матриц. Для образования системы кодирования, трансляции и репликации необходимо, чтобы сформировался процесс, избирательно вызывающий обогащение только функциональными РНК (фРНК). Для этого необходим механизм, позволяющий разделять молекулы на фРНК, способные связывать лиганды метаболитов, для которых селективно перезапускается репликация, и нефункциональные РНК, не связывающие лиганды и разрушающиеся [93]. Для иллюстрации такого решения Wong et al. [94] была предложена модель самоаминоацилирующих рибозимных матриц (англ. Self-rARS Template, SART) (рис. 6).

Изучение рибозимов, обладающих аминокислотной активностью, привело к обнаруже-

нию самоаминоацилирующих рибозимов (англ. Self-rARS) с различной структурой и аминокислотной специфичностью [95–98]. Это открытие позволяет предположить, что такие Self-rARS были отнюдь не редким явлением в гипотетическом мире РНК. Эти Self-rARS осуществляли бы различные типы реакций. Помимо катализа *цис*-аминоацилирования их собственных 2'(3')-ОН, 5'-ОН или внутреннего 2'-ОН, некоторые из них могли быть способны трансаминировать субстратную РНК. Конъюгаты аминокислот и rARS, образованные Self-rARS посредством *цис*-аминоацилирования, могли связываться с кодонными сайтами на матрице функциональной РНК и включать их аминокислотные фрагменты в пептид, связанный с ней. При этом могла использоваться либо собственная трансаминирующая активность, либо принимал участие специализированный трансаминирующий рибозим, например, пяти-нуклеотидный rARS, который работает с различными аминокислотами [97]. В любом случае, порядок кодонов сайтов для различных собственных rARS на РНК-матрице определял аминокислотную последовательность получающегося в результате пептида [94].

Надо отметить, что существование в рамках РНК-мира рибозимных aaRS, функционирующих столь же эффективно, что и современные белковые аминокислотные ферменты, привело бы к ситуации, когда отсутствовала бы необходимость в этих компонентах системы трансляции именно белковой природы.

Гипотеза РНК-коферментов – кодирующих коферментных «ручек». Существует другая гипотеза, связывающая РНК-мир и аминокислоты, – The Coding Coenzyme Handle Hypothesis (CCH) [99], в которой аминокислоты действуют как коферменты для рибозимов. Данная теория

базируется на том, что многие современные коферменты обладают нуклеотидоподобными фрагментами, что может свидетельствовать об их возможном происхождении от мира РНК. В рибо-организмах нуклеотидоподобные части коферментов могли быть использованы в качестве «ручек» (возможно, несущих другие мелкие молекулы), благодаря чему рибозимы могли легко захватывать их и управлять ими.

В рамках данной гипотезы ранние адаптеры, предки современных антикодонов, были заряжены аминокислотами, действующими как коферменты рибозимов в метаболически сложном мире РНК. Предковые аминоксил-адаптерные синтетазы могли быть подобны современным самосплайсинговым интронам тРНК. Кодон/антикодон-дискриминаторный базовый комплекс, встроенный в эти синтетазы, мог бы сыграть важную роль в распознавании аминокислот.

ССН-гипотеза также пытается объяснить, каково было адаптивное преимущество генетического кода. Специфичность однозначного связывания аминокислот с «ручками» определяла то, какая аминокислота должна была быть присоединена, а рибозимы были первыми катализаторами этого процесса установления соответствия между триплетами и аминокислотами. Позже в ходе эволюции «ручки» превратились в адаптеры (тРНК), рибозимы были заменены белковыми аминоксил-тРНК-синтетазами, и многие рибозимы стали молекулами мРНК, потеряв свою первоначальную ферментативную активность. Таким образом, этот механизм мог являться преадаптацией к кодированию и трансляции [100].

Изначально предполагалось, что «ручки» могли быть моно- или динуклеотидными [99], однако только тринуклеотидные соединения могли обеспечить стабильное связывание [100]. В работе Kazakov и Altman [101] показано, что тринуклеотид может катализировать металл — ион-зависимое расщепление специфического мотива последовательности РНК GAAA.

Согласно теории коферментных «ручек» [100], предполагается, что сначала возникла антикодоновая шпилька тРНК, а акцепторный ствол тРНК был эволюционным следствием. Свидетельством этого являются данные [102], благодаря которым была обнаружена эволюционная связь между антикодоном и первым—третьим триплетом (и иногда семидесятым—семьдесят вторым) в акцепторном стволе. Далее шпилька антикодона могла стать более длинной, несущей повтор антикодона на 3'-конце молекулы благодаря появлению адаптеров, которые связывают аминокислоту с по-

мощью более реакционноспособных сложно-эфирных связей.

НУКЛЕОПЕПТИДНЫЙ МИР

Некоторые исследователи [103—105] предположили, что полноценного мира РНК на самом деле никогда не существовало: вместо этого они предполагают очень раннюю коэволюцию РНК и пептидов в «рибонуклеопептидном» мире. Свидетельством в пользу такого сценария является предполагаемое постепенное добавление рибосомных белков к рибосомным РНК [106]. Таким образом, возможно, образовавшиеся рибосомные РНК начали взаимодействовать с аминокислотами или пептидами, что повысило стабильность, эффективность и специфичность примитивной рибосомы [104]. На более поздней стадии эволюции генетически кодируемые белки могли заменить эти пептиды. Следовательно, строгое сохранение структуры рибосомных белков и их повсеместное присутствие во всех трёх доменах жизни отражают их важный вклад в поддержании структуры и функции рибосомы [104]. Кроме того, рибосомы не могут функционировать без своих белковых частей, что может свидетельствовать об одновременном возникновении белковой части и РНК [107]. Соответственно, другие рибонуклеопротеиды, такие как сплайсосома и РНКазы Р, могли столкнуться с той же эволюционной судьбой. И хотя сплайсосома, как предполагается, возникла из самосплайсирующихся интронов группы II, которые не нуждаются в белках для собственного сплайсинга, белки им всё же необходимы для фолдинга и стабилизации РНК, а также обратной транскрипции [108].

В целом большинство рибозимов имеют ограниченные каталитические ресурсы и не демонстрируют каких-либо доказательств значительной сложности [29]. Взаимодействие между пептидами и рибозимами могло существовать на ранних этапах эволюции и эффективно способствовать увеличению каталитического разнообразия рибозимов, придавая новые функции рибозимам и ускоряя эволюционный процесс [104].

Система из двух полимераз. К коэволюционным теориям развития ранних событий эволюции можно отнести теорию о двух полимеразах Kunin [109]. Он предложил теорию зарождения репликаторно-трансляционной системы, включающуюся в возникновении tandemно работающих молекул: РНК, катализирующей образование пептидных связей, и олигопептида, катализирующего репликацию РНК. Благодаря

способности молекулы РНК катализировать образование пептидных связей синтезировались олигопептиды из аминокислот, доступных в «первичном бульоне». По такому механизму могло происходить присоединение аминокислот как к коротким пептидам, так и непосредственно к аминокислотам. Короткие пептиды могли также образовывать пептидные связи друг с другом вследствие неспецифического пептидилтрансферазного катализа молекулой РНК. Рост цепи прекращался из-за пространственных помех, поскольку пептидная цепь становилась длиннее и приобретала трёхмерную структуру. Среди таких синтезированных пептидов могли быть и пептиды, обладающие активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы. Эта активность олигопептидов позволила бы реплицировать молекулы РНК. Реакция полимеризации использовала РНК в качестве матрицы и рибонуклеотиды, доступные в окружающей среде, и могла протекать в две температурно-зависимые стадии. При повышенных температурах водородные связи между участками молекул РНК разрушались, делая молекулы доступными для РНК-зависимой РНК-полимеразы, катализировавшей полимеризацию РНК. Когда температура снижалась, молекулы РНК укладывались во вторичную структуру и снова становились способны катализировать образование пептидных связей. Смена дня и ночи могла быть причиной таких температурных колебаний [109].

Последовательность молекул РНК в рамках данной гипотезы зависела от процесса естественного отбора. Наследственность в системе поддерживалась через сохранение нуклеотидной последовательности молекул РНК. Неточная репликация и, возможно, другие типы мутаций могли давать материал для отбора. Улучшение каталитической активности РНК привело бы к увеличению концентрации каталитических пептидов в ближайшем микроокружении, а каталитические пептиды, в свою очередь, реплицировали бы ближайшую доступную РНК, т.е. в большинстве случаев ту, которая послужила матрицей для их синтеза. В результате лучший РНК-катализатор имел больше шансов быть воспроизведённым. Таким образом, такая двухполимеразная система может рассматриваться как примитивный дарвиновский организм [109].

При кажущейся простоте теории сам автор теории указывает на её проблемы. 1. Достаточно ли специфичности системы для успешного синтеза РНК-полимераз? 2. Будут ли неизбежно образованы случайные ферменты, расходующие «впустую» активированные мономеры? 3. Является ли синтез пептидов возможным при нали-

чии только одной молекулы РНК? [109]. Описанная двухполимеразная система может быть инициирована появлением одного компонента — одна каталитическая РНК может синтезировать пептид с РНК-полимеразной активностью, тем самым создавая всю систему, а пептидная РНК-полимераза, не имеющая матрицы, могла бы способствовать случайному синтезу молекул РНК с периодическим образованием функциональных рибозимов. Это означает, что появление любого компонента системы могло запустить автокаталитический каскад [109]. При этом данная гипотеза не описывает появление системы кодирования, и обе полимеразы формируются случайным образом среди пула нефункциональных РНК и олигопептидов. Такая гипотетическая пептидная полимераз не кодирована, а значит, не сможет воспроизводиться, а полимераз из РНК не сможет вести процессивный синтез пептида, обладающего полимеразной активностью.

Гипотеза прогенов. Существует альтернативная РНК-миру гипотеза о возникновении генетической системы клетки — гипотеза прогенов, предложенная Альтштейном [107, 110, 111]. Данная гипотеза объяснила возникновение одновременного синтеза полипептидов и полинуклеотидов, которые эволюционируют не последовательно, а взаимосвязанно. Согласно этой гипотезе, нуклеотиды сначала объединялись в аминокислотированные тринуклеотиды (прогены), которые являлись единственным субстратом для одновременного синтеза полинуклеотида и полипептида, при этом последовательность аминокислот кодировалась в полинуклеотиде, а образующийся полипептид обладал свойствами процессивной полимеразы (прогенлигазы). Общая формула прогена $NpNpNr\sim pX\sim aa$, где N — нуклеозид, p — фосфат, X — бифункциональный агент, например рибоза или другой углевод, aa — аминокислота, $\sim$ — макроэргическая связь. При этом аминокислота специфична по отношению к своему триплету.

В рамках данной гипотезы прогены образуются путём соединения динуклеотида $NpNp$ и аминокислотированного нуклеотида $Np\sim pX\sim aa$, специфически обусловленного взаимодействием динуклеотида и аминокислоты третьего нуклеотида. Механизм образования прогенов представлен на рис. 7. Этот механизм позволяет объяснить первичное возникновение генетического кода и отбор веществ для возникающей генетической системы, включая гомохиральность [95, 96]. Фосфат в нуклеотидах прогена находится на 3'-, а не на 5'-конце (это повышает вероятность образования фосфодиэфирной связи), и третий нуклеотид должен обязательно

быть дезоксирибонуклеотидом, второй — чаще дезоксирибонуклеотидом, а первый — чаще рибонуклеотидом, т.е. полинуклеотид является полирибозидезоксирибонуклеотидом.

Такие прогены являются мономерами для одновременного синтеза полинуклеотида и полипептида (рис. 7). Два прогена за счёт слабого стэкинг-взаимодействия сближаются друг с другом, и второй проген удерживается рядом с первым взаимодействием с аминокислотой первого. Стабилизируется комплекс комплементарным олигонуклеотидом, состоящим из 6 нуклеотидов. *N*-Конец аминокислоты второго прогена сближается с активированным *C*-концом аминокислоты первого прогена; образуется дипептид, связанный со вторым прогеном. *N*-Концевая аминокислота дипептида, Glu или Asp (из-за их кислотных боковых групп), влияет на образование фосфодиэфирной связи между первым и вторым прогенами. В результате образуется гексануклеотид, связанный с дипептидом. Дипептид обладает повышенной (по сравнению с одной аминокислотой) способностью удерживать следующий проген, и весь процесс повторяется, при этом дипептид переносится на третий проген (транспептидация) и помогает последнему присоединяться к гексануклеотиду. Образуется нонануклеотид с трипептидом. Таким образом, при присоединении прогенов каждый триплет запоминает кодируемую аминокислоту и устанавливается связь «генотип (порядок триплетов в полинуклеотиде)—фенотип (порядок аминокислот в полипептиде)» [107].

Растущий пептид постоянно участвует в формировании системы: если последняя аминокислота, присоединяющаяся к пептиду, увеличивает вероятность включения следующего прогена, рост всей системы продолжается; если уменьшает — рост системы останавливается. Таким образом, возникающий полипептид-фермент растёт в тесном взаимодействии с его будущим субстратом (прогеном) и, как очень редкое

событие, формируется связанная пара «ген—процессивная полимераз (прогенлигаза)», причём полимераз имеет тропность к 3'-концу полинуклеотида.

Полимераза, расположенная на 3'-конце гена, перемещается к 5'-концу, соединяя прогены, комплементарные матрице. Одновременно синтез комплементарного полинуклеотида происходил посредством репликации и транскрипции, поскольку исходный ген был представлен (–)-цепью, и сопровождается синтезом «неправильного» белка, кодируемого (–)-цепью. Полимераза перемещается к 3'-концу вновь синтезированной (+)-цепи и реплицирует её, одновременно формируя новую молекулу полимеразы и новую (–)-цепь. Две молекулы полимеразы дополнительно создают две новые (+)-цепи. Затем синтезируются две новые (–)-цепи и две дополнительные молекулы полимеразы (всего 4 молекулы полимеразы).

Таким образом, гипотеза прогенов предлагает единый механизм, который позволяет объяснить: 1) возникновение генетического кода; 2) механизм отбора компонентов для образования генетической системы, в том числе возникающей гомохиральности; и 3) возникновение и размножение бимолекулярной генетической системы, состоящей из гена полинуклеотида и белковой процессивной полимеразы, кодируемой этим геном.

Согласно данной гипотезе, возникшая бимолекулярная система — это первый вирусоподобный организм (*Protoviroidum primum*), который размножается и эволюционирует путём единого процесса репликации, транскрипции и трансляции и является прародителем жизни на Земле [107]. Экспериментальная химическая проверка механизма образования прогенов принципиально возможна, но пока не осуществлена.

Гипотеза урзимов. Согласно другой гипотезе, описанной Li et al. [112], катализ и кодирование

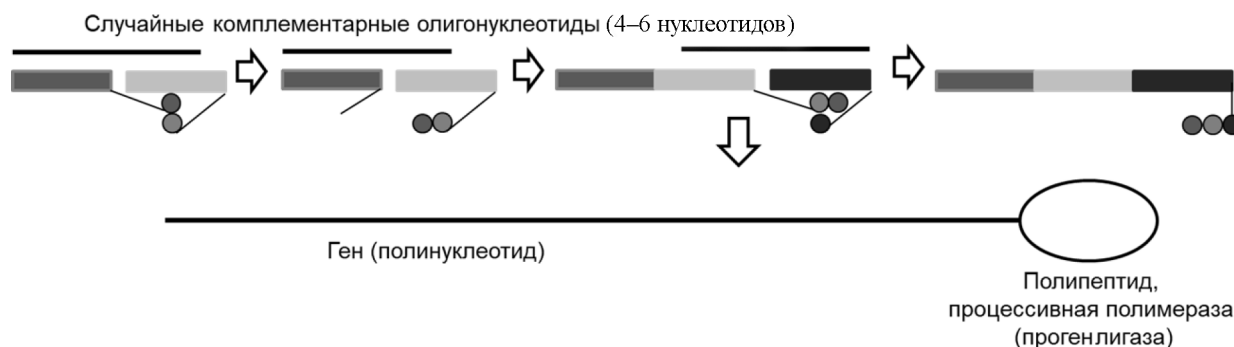


Рис. 7. Формирование бимолекулярной генетической системы из прогенов. Модифицировано по [107]

совместно развились благодаря одновременно-му образованию пептидов и РНК.

В центре этой гипотезы лежат «урзимы», представляющие собой небольшие (120–130 аминокислот), высококонсервативные фрагменты доменов двух суперсемейств аминоацил-тРНК-синтетаз (aaRS). Два этих суперсемейства — aaRS I и aaRS II — были когда-то закодированы противоположными цепями одного и того же гена [113]. В отличие от рибозимов, которые лежат в основе гипотезы о мире РНК, пары урзимов I- и II-классов представляют собой консенсусные предковые формы, достаточные для кодон-направленного синтеза неслучайных пептидов. Наличие механизма «активации» аминокислот экспоненциально увеличивает эффективность их полимеризации, а возникновение урзимов решает эту проблему. Урзимы значительно снижают структурную сложность, необходимую для осуществления трансляции рудиментарного генетического кода. Таким образом, урзимы проявляют каталитические свойства задолго до полного формирования генетического кода.

Урзимная модель коэволюции предполагает стереохимическое «комплементарное» взаимодействие между РНК и пептидами, основывающееся на примитивном генетическом коде, в котором каждый нуклеотид в дуплексе РНК соответствует двум аминокислотам, а каждый дипептид определяет соответствующее основание. Подобное взаимодействие описано в работе Carter и Kraut [114]. Стереохимическое кодирование могло генерировать пептиды и соответствующие им РНК-гены. При этом такие гены будут иметь длину гена тРНК (~72 основания). Таким образом, мир, основанный на коэволюции РНК и белков, состоял из коротких РНК-«генов» и кодируемых ими небольших белков, специфически аминоацилирующих молекулы РНК, благодаря которым осуществлялась рибозимная трансляция.

Автор такой гипотезы о коэволюции РНК и белков, Carter [115], предлагает следующий сценарий пребиотической эволюции: в течение длительного периода химической эволюции мономеры аминокислот и нуклеиновых кислот начали собираться в ковалентные комплексы, включающие структурно «комплементарные» олигонуклеотиды и дипептиды; далее могли происходить синтез и лигирование пептидов и олигонуклеотидов, специфичность которых была бы ограничена спариванием нуклеотидных оснований и грубым стереохимическим кодированием между двумя типами полимеров, присоединяющих новые мономеры таким образом, чтобы стабилизировать двойной спиральный

комплекс пептид–РНК; комплексы росли в длину, возможно, до размера предполагаемого гена, кодирующего 23-аминокислотные смысловые/антисмысловые продукты. 23-аминокислотные смысловые/антисмысловые пептиды стали родоначальниками aaRS ферментов класса I и II; 23-аминокислотные пептиды были лигированы в 46-аминокислотный белок, обладавший большей эффективностью аминоацилирования. Некоторые из образовавшихся пептидов всё более специализировались как полимеразы нуклеиновых кислот, другие аминоацилировали двухцепочечную РНК, двухцепочечная РНК сохранила свою роль шаблона репликации и развила пептидилтрансферазную активность, став большой рибосомальной субъединицей. Одноцепочечная РНК стала всё чаще брать на себя доминирующую роль матрицы и эволюционировала в современную мРНК [115].

Авторы гипотезы об урзимах, Li et al. [112], указывают на два недостатка РНК-мира: 1) отсутствие естественных рибозимов, реплицирующих РНК, активирующих аминокислоты и аминоацилирующих тРНК, и 2) зависимость рибозимного пути от раннего появления точной репликации. Такой путь не предлагает механизма для преодоления «обрыва Эйгена» [116]. Оба этих слабых места, согласно Li et al. [112], объясняются совместной эволюцией пептидных катализаторов и РНК.

Данная гипотеза интересна для понимания эволюции трансляции, но не даёт чёткого проверяемого ответа на вопрос о кодировании других пептидов. Непонятно, как может эволюционировать такая система, в которой белки для репликации не кодируются РНК.

БЕЛКОВЫЙ МИР

Гипотеза GADV-белкового мира. Гипотеза GADV-белкового мира основана на наблюдении, что белки, содержащие примерно одинаковое количество четырёх аминокислот (глицина — G (gly), аланина — A (ala), аспарагиновой кислоты — D (asp) и валина — V (val)), могут образовывать основные вторичные структуры белка — α -спирали и β -слои [117, 118]. В рамках этой теории предполагается, что основные GADV-белки могли полимеризоваться случайно из этих четырёх аминокислот, формируя глобулы. Согласно этой гипотезе, пребиотический мир до появления генов включал стадию, на которой GADV-белки были способны к псевдо-репликации. Возникновение примитивных биологических систем в таком случае должно было проходить следующие стадии: 1) пребиотичес-

кий синтез и накопление gly, ala, asp и val; 2) случайное формирование белков из этих четырёх аминокислот; 3) формирование первичной метаболической системы за счёт активности GADV-белков, синтез нуклеотидов и олигонуклеотидов РНК; 4) формирование первичного генетического кода и образование генов; 5) образование двойной спирали РНК, возникновение наследственности и передачи генетического материала поколениям — начало биологической эволюции; 6) эволюция генетического кода и генетических систем.

Согласно этой гипотезе, примитивный генетический код состоял из предварительного GNC-кода, включавшего четыре кодона — GGC, GCC, GAC и GUC, кодирующих 4 основные аминокислоты GADV-мира: gly, ala, asp и val. Затем произошло расширение генетического кода до 16 кодонов (GGC, GGG, GCC, GCG, GAC, GAG, GUC, GUG, CUC, GUG, CCC, CCG, CAC, CAG, CGC и CGG), кодировавших 10 аминокислот (gly, ala, asp, val, glu, leu, pro, his, gln и arg) [119]. Порядок появления аминокислот в пребиотическом GADV-мире примерно совпадает с установленным Trifonov [120] эволюционным порядком образования аминокислот, основанном на 60 различных критериях.

Примитивные одноцепочечные нуклеиновые кислоты состояли из GNC-повторяющихся последовательностей и были получены путём образования фосфодиэфирной связи между кодонами GNC. Двухцепочечные молекулы образовывались при комплементарном спаривании молекул (GNC)_n или кодонов GNC, и, таким образом, была сформирована первичная система репликации [121].

Проблемой гипотезы «белкового мира» является то, что стабильная и функциональная структура возможна только для коротких пребиотических пептидов, а случайное формирование правильной пространственной укладки сложных пептидов/белков в таких условиях практически невозможно. Кроме того, пробелом данной теории является отсутствие чёткого пути для репликации и передачи информации на ранних этапах эволюции, основанных на пептидах.

ЛИПИДНЫЙ МИР

Гипотезы липидного мира [122–124] предполагают, что простые гидрофобные молекулы липидов могут сохранять и распространять информацию, таким образом, претерпевая эволюцию.

Модель GARD. Модель липидного мира Lancet et al. [124] основывается на предположе-

нии, что воспроизведение состава компонентов пребиотического мира предшествует репликации непосредственно информационных последовательностей. Согласно этому взгляду на протобиологию, первые репликаторы были скоплениями спонтанно объединяющихся, гетерогенных и в основном неканонических (не образующих бислойные структуры) амфифильных веществ. Это предположение подтверждается построением химической кинетики модели репликации мицеллярного автокатализа (англ. Graded autocatalysis replication domain, GARD) [122]. Согласно GARD, в пребиотическом мире существовал отбор неравновесных агрегаций веществ (композомов), которые могли быть способны к автокаталитическому гомеостатическому росту [124]. Такой процесс, наряду со случайным делением композома, воплощал в себе примитивное клеточное размножение. При наличии в среде амфифильных веществ из них самоформируются мицеллы, этот факт может служить предпосылкой для возникновения самоподдерживающихся автокаталитических липидных систем. В таком случае GARD-эволюция мира-до-РНК проявлялась в отборе различных композомов в пределах разреженного ландшафта пригодности в ответ на химические изменения окружающей среды. По модели GARD «генотипом» являлся сам композом, т.е. состав автокаталитических мицелл, и он же определял способность к репликации, т.е. «фенотип» системы. «Геном» композома в такой системе оказывает прямое кинетическое влияние на эффективность и точность гомеостатического роста, следовательно, на его репликацию. Таким образом, авторы гипотезы указывают на корреляцию между мутациями в системе и её репродукцией без необходимости в посреднике, таком как кодируемый белок или функциональная РНК [124]. Гипотеза предполагает раннее объединение ключевых компонентов биологии в липидной протоклетке: амфифильные композомы могли включать аминокислоты и пептиды, азотистые основания РНК и олигонуклеотиды, способные к комплементарному спариванию, кофакторы, хелаторы металлов, тиолы, олигофосфаты и многие другие соединения, между которыми формировались метаболические связи. Данная модель не даёт ответов на вопросы о возникновении именно генетических систем, но связывает при этом между собой разные классы молекул. Кроме того, моделирование GARD демонстрирует в образующихся системах те же термодинамические и кинетические особенности, которые соответствуют предполагаемому предшественнику современных живых клеток. GARD композомы характеризуются ав-

торами как диссипативные системы, что также является отличительными признаками жизни [124]. При этом сами авторы гипотезы указывают на скудость экспериментальных данных для взаимно каталитических сетей.

РНК-липидный мир. Идея возникновения жизни из амфифильных композитов [122] была развита в гипотезе РНК-липидного мира Mallik и Kundu [123]. Гипотеза о коэволюции липидов и РНК основана на предположении, что современные стабильные взаимодействия липид–РНК — это молекулярные «окаменелости» древней стадии эволюции, когда мир РНК возник из мира липидов. Предполагается, что древние рибозимы были «защищены» липидами, что обеспечило их выживание в жёстких условиях пребиотического океана. Присутствующие в окружающей среде ионы металлов могли катализировать репликацию РНК внутри защищённых липидных мицелл. Авторами представлен возможный в рамках этой модели механизм трансляции и перехода от РНК-липидного мира к РНК-белковому: РНК—прото-рибосомы, прикреплённые к внутреннему слою липидного пузырька, случайно полимеризовали аминокислоты. Синтез случайных полипептидов в большом пуле везикул мог привести к образованию функциональных белков, которые могли сыграть важную роль в ранней эволюции [123].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши знания и представления о современных организмах и молекулах, которые они содержат, обеспечивают формирование предпосылок для предположения о том, что развитие биологических систем началось с эволюции семейств молекул, которые могли бы катализировать их собственную репликацию. Существует большое количество гипотез, которые описывают подобные сценарии, наиболее широко известные из них мы постарались представить в данном обзоре. Однако практически ни одна из этих гипотез не описывает без пробелов и допущений все этапы ранней эволюции генетических систем.

Гипотеза РНК-мира сегодня является главенствующей научной идеей, и существует немало доводов в её пользу, которые мы описали и которым посвящено множество работ, в том числе рассмотренных в настоящем обзоре. В рамках этой теории разработано много вероятных механизмов эволюции компонентов трансляции. При этом главная проблема мира РНК до сих пор не решена — не достигнуто полное самовоспроизведение РНК. Открытие процессивной рибозимной полимеразы (репликазы), способ-

ной реплицировать длинные полинуклеотидные последовательности, решительно укрепило бы позиции гипотезы мира РНК, но такого достижения ещё нет [38]. В настоящее время не известно ни одной построенной только из нуклеотидов процессивной полимеразы. Яркими примерами таких молекулярных машин являются разнообразные современные ДНК- и РНК-полимеразы, которые имеют чисто белковую или нуклеопротеидную природу [125]. Очень выразительна ситуация с рибосомой, которая, по сути, является молекулярной машиной, полимеризующей аминокислоты при движении по полинуклеотидной матрице (мРНК). Известно, что рибосомная РНК является рибозимом, способным соединять аминокислоты пептидной связью [125]. Однако рибосома содержит 30–40% белка, без которого не может выполнять свою функцию. После 1990 г. были искусственно получены рибозимы со свойствами РНК-полимеразы [22, 23], однако это полимеразы дистрибутивного типа, не способные двигаться по матрице. Таким образом, рибозимы могут образовывать и фосфодиэфирные связи между нуклеотидами, и пептидные связи между аминокислотами, но, вероятно, не способны без белка выполнять функцию молекулярных машин. Если это действительно так, гипотеза мира РНК является таким же тупиковым направлением для решения проблемы происхождения жизни, как и гипотеза Опарина [126], поскольку не может предложить конкретного механизма возникновения генетической системы.

Кроме того, несмотря на то что РНК обладает способностью выполнять многие функции белковых ферментов, нет данных об участии рибозимов в функционировании клеточных систем, которые должны были возникнуть на самых ранних этапах биологической эволюции. Так, рибозимы не принимают участия в синтезе нуклеотидов, в работе энергетических систем, в аминокислотилировании тРНК. При этом искусственно получены рибозимы, способные эффективно и специфично аминокислотилировать тРНК [95–98], но все естественные aaRS являются белками. Эти факты трудно совместимы с гипотезой мира РНК и позволяют думать о том, что кодированный синтез белка имел место на самых ранних этапах эволюционного развития живого мира.

Представляется разумной идея о коэволюции двух типов макромолекул — нуклеиновых кислот и белков. Такой сценарий не столь экономичен в эволюционном отношении, как живой мир на основе одной только РНК, однако, вероятно, что пептиды (и полипептиды) играли важную роль в раннем биологическом мире. Ги-

потезой, которая хорошо дополняет мир РНК вероятными ранними белковыми молекулами, требовавшимися для осуществления трансляции, является гипотеза урзимов. Эволюционно консервативные aaRS двух классов могли способствовать более точному установлению соответствия тРНК и аминокислот в трансляции. Комплементарные цепи РНК кодировали каждая свой пептид, невысокая точность репликации могла привести к образованию новой молекулы, при этом её функциональность могла не нарушиться при сохранении пространственной структуры. И таким образом, гипотеза урзимов избегает «обрыва Эйгена», потому что наиболее важным её ограничением является не точность последовательности, а сохранение структурных элементов и каталитических активностей коротких полипептидных шпилек. При этом маловероятным совпадением кажется сохранение комплементарности цепочек РНК, кодирующих такие пептиды, при низкой точности репликации.

Идея о том, что генетические системы сформировались на основе двух коэволюционирующих макромолекул разных классов, реализована в гипотезе двух полимераз, а также в гипотезе прогенов. В последней на основе одного принципа (образование аминокислотированных нуклеотидных триплетов) теоретически решаются несколько важнейших проблем теории возникновения жизни: отбор веществ, включая гомохиральность, механизм возникновения первич-

ного генетического кода и первой бимолекулярной генетической системы, реплицирующейся на основе единого процесса репликации-транскрипции-трансляции. Автором предлагается уникальная концепция возможного первого живого неклеточного организма — протовироида и описывается принципиальный механизм его биологической (дарвиновской) эволюции в направлении к клетке. Главный недостаток гипотезы заключается в отсутствии её экспериментальной проверки, которая, однако, принципиально возможна.

Критика рассмотренных представлений о возникновении и эволюции трансляции не означает, что важные экспериментальные данные, полученные на основе гипотезы РНК-мира, и идеи, выдвинутые в этой и других гипотезах, не могут быть использованы для понимания важных аспектов эволюции живого мира и не могут быть положены в основу будущих экспериментов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

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

- Dodd, M. S., Papineau, D., Grenne, T., Slack, J. F., Rittner, M., et al. (2017) Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates, *Nature*, **543**, 60-64, doi: 10.1038/nature21377.
- Benner, S. A. (2010) Defining life, *Astrobiology*, **10**, 1021-1030, doi: 10.1089/ast.2010.0524.
- Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2007) On the origin of the translation system and the genetic code in the RNA world by means of natural selection, exaptation, and subfunctionalization, *Biol. Direct*, **2**, 14, doi: 10.1186/1745-6150-2-14.
- Nikolaeva, D. D., Gelfand, M. S., and Garushyants, S. K. (2021) Simplification of ribosomes in bacteria with tiny genomes, *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 58-66, doi: 10.1093/molbev/msaa184.
- Eigen, M. (1971) Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules, *Naturwissenschaften*, **58**, 465-523, doi: 10.1007/bf00623322.
- Penny, D. (2005) An interpretive review of the origin of life research, *Biol. Philos.*, **20**, 633-671, doi: 10.1007/s10539-004-7342-6.
- Eigen, M., and Schuster, P. (1977) The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle, *Naturwissenschaften*, **64**, 541-565, doi: 10.1007/BF00450633.
- Szathmáry, E. (1986) Some remarks on hypercycles and the stochastic corrector model, *Endocyt. Cell Res.*, **3**, 337-339.
- Szathmáry, E., and Demeter, L. (1987) Group selection of early replicators and the origin of life, *J. Theor. Biol.*, **128**, 463-486.
- Zintzaras, E., Santos, M., and Szathmáry, E. (2002) "Living" under the challenge of information decay: the stochastic corrector model vs. hypercycles, *J. Theor. Biol.*, **217**, 167-181.
- Gago, S., Elena, S. F., Flores, R., and Sanjuan, R. (2009) Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid, *Science*, **323**, 1308, doi: 10.1126/science.1169202.
- Koonin, E. V., and Novozhilov, A. S. (2017) Origin and evolution of the universal genetic code, *Annu. Rev. Genet.*, **51**, 45-62, doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024713.
- Rich, A. (1962) *Horizons in Biochemistry* (Kasha, M., and Pullman, B., eds.) Academic Press, New York.
- Crick, F. H. (1968) The origin of the genetic code, *J. Mol. Biol.*, **38**, 367-379, doi: 10.1016/0022-2836(68)90392-6.
- Orgel, L. E. (1968) Evolution of the genetic apparatus, *J. Mol. Biol.*, **38**, 381-393, doi: 10.1016/0022-2836(68)90393-8.
- Gilbert, W. (1986) Origin of life: The RNA world, *Nature*, **319**, 618.
- Le Vay, K., and Mutschler, H. (2019) The difficult case of an RNA-only origin of life, *Emerg. Top. Life Sci.*, **3**, 469-475, doi: 10.1042/etls20190024.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., et al. (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena, *Cell*, **31**, 147-157, doi: 10.1016/0092-8674(82)90414-7.
- Robertson, H. D., Altman, S., and Smith, J. D. (1972) Purification and properties of a specific *Escherichia coli*

- ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor, *J. Biol. Chem.*, **247**, 5243-5251.
20. Klemm, B. P., Wu, N., Chen, Y., Liu, X., Kaitany, K. J., et al. (2016) The diversity of ribonuclease P: Protein and RNA catalysts with analogous biological functions, *Biomolecules*, **6**, doi: 10.3390/biom6020027.
 21. Walter, N. G., and Engelke, D. R. (2002) Ribozymes: catalytic RNAs that cut things, make things, and do odd and useful jobs, *Biologist*, **49**, 199-203.
 22. Johnston, W. K., Unrau, P. J., Lawrence, M. S., Glasner, M. E., and Bartel, D. P. (2001) RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension, *Science*, **292**, 1319-1325, doi: 10.1126/science.1060786.
 23. Wöchner, A., Attwater, J., Coulson, A., and Holliger, P. (2011) Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme, *Science*, **332**, 209-212, doi: 10.1126/science.1200752.
 24. Bowman, J. C., Hud, N. V., and Williams, L. D. (2015) The ribosome challenge to the RNA world, *J. Mol. Evol.*, **80**, 143-161, doi: 10.1007/s00239-015-9669-9.
 25. Ouzounis, C., and Kypides, N. (1996) The emergence of major cellular processes in evolution, *FEBS Lett.*, **390**, 119-123, doi: 10.1016/0014-5793(96)00631-x.
 26. Ganoza, M. C., Kiel, M. C., and Aoki, H. (2002) Evolutionary conservation of reactions in translation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 460-485, doi: 10.1128/mmbr.66.3.460-485.2002.
 27. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., et al. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560-567, doi: 10.1038/nsmb.2313.
 28. Hsiao, C., Lenz, T. K., Peters, J. K., Fang, P. Y., Schneider, D. M., et al. (2013) Molecular paleontology: a biochemical model of the ancestral ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3373-3385, doi: 10.1093/nar/gkt023.
 29. Bernhardt, H. S. (2012) The RNA world hypothesis: the worst theory of the early evolution of life (except for all the others)(a), *Biol. Direct*, **7**, 23, doi: 10.1186/1745-6150-7-23.
 30. Bregestovski, P. D. (2015) "RNA World", a highly improbable scenario of the origin and early evolution of life on earth, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **51**, 72-84, doi: 10.1134/S0022093015010111.
 31. Wills, P. R., and Carter, C. W., Jr. (2018) Insuperable problems of the genetic code initially emerging in an RNA world, *Biosystems*, **164**, 155-166, doi: 10.1016/j.biosystems.2017.09.006.
 32. Orgel, L. E. (2004) Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 99-123, doi: 10.1080/10409230490460765.
 33. Kim, H. J., Ricardo, A., Illangkoon, H. I., Kim, M. J., Carrigan, M. A., et al. (2011) Synthesis of carbohydrates in mineral-guided prebiotic cycles, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9457-9468, doi: 10.1021/ja201769f.
 34. Спирин А. С. (2007) Когда, где и в каких условиях мог возникнуть и эволюционировать мир РНК? *Палеонтологический журнал*, **41**, 11-19.
 35. Tupper, A. S., Shi, K., and Higgs, P. G. (2017) The role of templating in the emergence of RNA from the prebiotic chemical mixture, *Life*, **7**, 41, doi: 10.3390/life7040041.
 36. Szostak, J. W. (2012) The eightfold path to non-enzymatic RNA replication, *J. Syst. Chem.*, **3**, 2, doi: 10.1186/1759-2208-3-2.
 37. Joyce, G. F., and Orgel, L. E. (1986) Non-enzymic template-directed synthesis on RNA random copolymers. Poly(C, G) templates, *J. Mol. Biol.*, **188**, 433-441, doi: 10.1016/0022-2836(86)90166-x.
 38. Joyce, G. F., and Szostak, J. W. (2018) Protocells and RNA Self-Replication, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a034801.
 39. James, K. D., and Ellington, A. D. (1999) The fidelity of template-directed oligonucleotide ligation and the inevitability of polymerase function, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **29**, 375-390, doi: 10.1023/a:1006544611320.
 40. Prywes, N., Blain, J. C., Del Frate, F., and Szostak, J. W. (2016) Nonenzymatic copying of RNA templates containing all four letters is catalyzed by activated oligonucleotides, *eLife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.17756.
 41. Szostak, J. W. (2011) An optimal degree of physical and chemical heterogeneity for the origin of life? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **366**, 2894-2901, doi: 10.1098/rstb.2011.0140.
 42. Bartel, D. P., and Szostak, J. W. (1993) Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment], *Science*, **261**, 1411-1418, doi: 10.1126/science.7690155.
 43. Horning, D. P., and Joyce, G. F. (2016) Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 9786-9791, doi: 10.1073/pnas.1610103113.
 44. Samanta, B., and Joyce, G. F. (2017) A reverse transcriptase ribozyme, *eLife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.31153.
 45. Koonin, E. V. (2017) Frozen accident pushing 50: Stereochemistry, expansion, and chance in the evolution of the genetic code, *Life (Basel)*, **7**, doi: 10.3390/life7020022.
 46. Nirenberg, M. W., and Matthaei, J. H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 1588-1602.
 47. Gardner, R. S., Wahba, A. J., Basilio, C., Miller, R. S., et al. (1962) Synthetic polynucleotides and the amino acid code, VII, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 2087.
 48. Wahba, A. J., Gardner, R. S., Basilio, C., Miller, R. S., Speyer, J. F., et al. (1963) Synthetic polynucleotides and the amino acid code, VIII, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**, 116.
 49. Söll, D., Ohtsuka, E., Jones, D., Lohrmann, R., Hayatsu, H., et al. (1965) Studies on polynucleotides, XLIX. Stimulation of the binding of aminoacyl-sRNA's to ribosomes by ribotrinucleotides and a survey of codon assignments for 20 amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1378.
 50. Woese, C. R., Dugre, D. H., Dugre, S. A., Kondo, M., and Saxinger, W. C. (1966) On the fundamental nature and evolution of the genetic code, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **31**, 723-736, doi: 10.1101/sqb.1966.031.01.093.
 51. Woese, C. R. (1968) The fundamental nature of the genetic code: prebiotic interactions between polynucleotides and polyamino acids or their derivatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 110-117, doi: 10.1073/pnas.59.1.110.
 52. Yarus, M., Widmann, J. J., and Knight, R. (2009) RNA-amino acid binding: a stereochemical era for the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **69**, 406-429, doi: 10.1007/s00239-009-9270-1.
 53. Yarus, M. (1998) Amino acids as RNA ligands: A direct-RNA-template theory for the code's origin, *J. Mol. Evol.*, **47**, 109-117, doi: 10.1007/pl00006357.
 54. Yarus, M. (2000) RNA-ligand chemistry: a testable source for the genetic code, *RNA*, **6**, 475-484, doi: 10.1017/s1355838200002569.
 55. Yarus, M., Caporaso, J. G., and Knight, R. (2005) Origins of the genetic code: the escaped triplet theory, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 179-198, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133119.
 56. Koonin, E. V., and Novozhilov, A. S. (2009) Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma, *IUBMB Life*, **61**, 99-111, doi: 10.1002/iub.146.
 57. Hajnik, M., Osorio, J. I., and Zagrovic, B. (2014) Computational analysis of amino acids and their sidechain analogs in crowded solutions of RNA nucleobases with implications for the mRNA-protein complementarity hypothesis, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12984-12994.
 58. Hlevnjak, M., Polyansky, A. A., and Zagrovic, B. (2012) Sequence signatures of direct complementarity between mRNAs and cognate proteins on multiple levels, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8874-8882, doi: 10.1093/nar/gks679.

59. Polyansky, A. A., Hlevnjak, M., and Zagrovic, B. (2013) Analogue encoding of physicochemical properties of proteins in their cognate messenger RNAs, *Nat. Commun.*, **4**, 2784, doi: 10.1038/ncomms3784.
60. Polyansky, A. A., Hlevnjak, M., and Zagrovic, B. (2013) Proteome-wide analysis reveals clues of complementary interactions between mRNAs and their cognate proteins as the physicochemical foundation of the genetic code, *RNA Biol.*, **10**, 1248-1254, doi: 10.4161/rna.25977.
61. Gamow, G. (1954) Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures, *Nature*, **173**, 318.
62. Melcher, G. (1974) Stereospecificity of the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **3**, 121-140, doi: 10.1007/bf01796558.
63. Hendry, L., Bransome, E., Hutson, M., and Campbell, L. (1981) First approximation of a stereochemical rationale for the genetic code based on the topography and physicochemical properties of "cavities" constructed from models of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7440-7444, doi: 10.1073/pnas.78.12.7440.
64. Balasubramanian, R., Seetharamulu, P., and Raghunathan, G. (1980) A conformational rationale for the origin of the mechanism of nucleic acid-directed protein synthesis of "living" organisms, *Orig. Life*, **10**, 15-30, doi: 10.1007/bf00928940.
65. Shimizu, M. (1982) Molecular basis for the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **18**, 297-303, doi: 10.1007/bf01733895.
66. Massey, S. E. (2006) A sequential "2-1-3" model of genetic code evolution that explains codon constraints, *J. Mol. Evol.*, **62**, 809-810, doi: 10.1007/s00239-005-0222-0.
67. Wong, J. T. (1975) A co-evolution theory of the genetic code, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1909-1912, doi: 10.1073/pnas.72.5.1909.
68. Wong, J. T. (2005) Coevolution theory of the genetic code at age thirty, *Bioessays*, **27**, 416-425, doi: 10.1002/bies.20208.
69. Amirnovin, R. (1997) An analysis of the metabolic theory of the origin of the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **44**, 473-476, doi: 10.1007/pl00006170.
70. Ronneberg, T. A., Landweber, L. F., and Freeland, S. J. (2000) Testing a biosynthetic theory of the genetic code: fact or artifact? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13690-13695, doi: 10.1073/pnas.250403097.
71. Woese, C. R. (1965) On the evolution of the genetic code, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1546-1552, doi: 10.1073/pnas.54.6.1546.
72. Haig, D., and Hurst, L. D. (1991) A quantitative measure of error minimization in the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **33**, 412-417, doi: 10.1007/BF02103132.
73. Novozhilov, A. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2007) Evolution of the genetic code: partial optimization of a random code for robustness to translation error in a rugged fitness landscape, *Biol. Direct*, **2**, 24, doi: 10.1186/1745-6150-2-24.
74. Mukai, T., Lajoie, M. J., Englert, M., and Söll, D. (2017) Rewriting the genetic code, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 557-577.
75. Спирин А. (2001) Биосинтез белков, мир РНК и происхождение жизни, *Вестник Российской академии наук*, **71**, 320-328.
76. Spirin, A. (2013) The emergence of molecular machines as a prerequisite of the ancient RNA world evolution, *Paleontol. J.*, **47**, 1016-1029.
77. Schimmel, P. (2011) The RNP bridge between two worlds, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **12**, 135, doi: 10.1038/nrm3061.
78. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, **289**, 920-930, doi: 10.1126/science.289.5481.920.
79. Dunn, I. S. (2011) RNA templating of molecular assembly and covalent modification patterning in early molecular evolution and modern biosystems, *J. Theor. Biol.*, **284**, 32-41, doi: 10.1016/j.jtbi.2011.06.009.
80. Ma, W. (2010) The scenario on the origin of translation in the RNA world: in principle of replication parsimony, *Biol. Direct*, **5**, 65, doi: 10.1186/1745-6150-5-65.
81. Rodin, S., Rodin, A., and Ohno, S. (1996) The presence of codon-anticodon pairs in the acceptor stem of tRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4537-4542, doi: 10.1073/pnas.93.10.4537.
82. Tamura, K. (2015) Origins and early evolution of the tRNA molecule, *Life (Basel)*, **5**, 1687-1699, doi: 10.3390/life5041687.
83. Di Giulio, M. (1992) On the origin of the transfer RNA molecule, *J. Theor. Biol.*, **159**, 199-214, doi: 10.1016/s0022-5193(05)80702-7.
84. Widmann, J., Di Giulio, M., Yarus, M., and Knight, R. (2005) tRNA creation by hairpin duplication, *J. Mol. Evol.*, **61**, 524-530, doi: 10.1007/s00239-004-0315-1.
85. Caetano-Anolles, D., and Caetano-Anolles, G. (2016) Piecemeal buildup of the genetic code, ribosomes, and genomes from primordial tRNA building blocks, *Life (Basel)*, **6**, doi: 10.3390/life6040043.
86. De Farias, S. T., Rêgo, T. G., and José, M. V. (2021) Origin of the 16S ribosomal molecule from ancestor tRNAs, *J. Mol. Evol.*, **89**, 249-256, doi: 10.1007/s00239-021-10002-8.
87. Petrov, A. S., Gulen, B., Norris, A. M., Kovacs, N. A., Bernier, C. R., et al. (2015) History of the ribosome and the origin of translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 15396-15401, doi: 10.1073/pnas.1509761112.
88. Demongeot, J., and Seligmann, H. (2020) Comparisons between small ribosomal RNA and theoretical minimal RNA ring secondary structures confirm phylogenetic and structural accretion histories, *Sci. Rep.*, **10**, 1-14.
89. Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H., and Ramakrishnan, V. (2015) The structure of the human mitochondrial ribosome, *Science*, **348**, 95-98.
90. Seligmann, H., and Raoult, D. (2018) Stem-loop RNA hairpins in giant viruses: invading tRNA-like repeats and a template free RNA, *Front. Microbiol.*, **9**, 101.
91. De Farias, S. T., Rego, T. G., and Jose, M. V. (2016) tRNA core hypothesis for the transition from the RNA world to the ribonucleoprotein world, *Life (Basel)*, **6**, doi: 10.3390/life6020015.
92. Noller, H. F. (2012) Evolution of protein synthesis from an RNA world, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a003681, doi: 10.1101/cshperspect.a003681.
93. Wong, J. T. (2014) Emergence of life: From functional RNA selection to natural selection and beyond, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **19**, 1117-1150, doi: 10.2741/4271.
94. Wong, J. T., Ng, S. K., Mat, W. K., Hu, T., and Xue, H. (2016) Coevolution theory of the genetic code at age forty: Pathway to translation and synthetic life, *Life (Basel)*, **6**, doi: 10.3390/life6010012.
95. Illangsekare, M., Sanchez, G., Nickles, T., and Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA, *Science*, **267**, 643-647, doi: 10.1126/science.7530860.
96. Lee, N., Bessho, Y., Wei, K., Szostak, J. W., and Suga, H. (2000) Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 28-33, doi: 10.1038/71225.
97. Suga, H., Hayashi, G., and Terasaka, N. (2011) The RNA origin of transfer RNA aminoacylation and beyond, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **366**, 2959-2964, doi: 10.1098/rstb.2011.0137.
98. Turk, R. M., Chumachenko, N. V., and Yarus, M. (2010) Multiple translational products from a five-nucleotide ribozyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4585-4589, doi: 10.1073/pnas.0912895107.
99. Szathmari, E. (1993) Coding coenzyme handles: a hypothesis for the origin of the genetic code, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9916-9920, doi: 10.1073/pnas.90.21.9916.
100. Szathmari, E. (1999) The origin of the genetic code: Amino acids as cofactors in an RNA world, *Trends Genet.*, **15**, 223-229, doi: 10.1016/s0168-9525(99)01730-8.
101. Kazakov, S., and Altman, S. (1992) A trinucleotide can promote metal ion-dependent specific cleavage of RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7939-7943, doi: 10.1073/pnas.89.17.7939.

102. Rodin, S. N., and Ohno, S. (1997) Four primordial modes of tRNA-synthetase recognition, determined by the (G,C) operational code, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5183–5188, doi: 10.1073/pnas.94.10.5183.
103. Di Giulio, M. (2008) An extension of the coevolution theory of the origin of the genetic code, *Biol. Direct*, **3**, 37, doi: 10.1186/1745-6150-3-37.
104. Saad, N. Y. (2018) A ribonucleopeptide world at the origin of life, *J. Syst. Evol.*, **56**, 1–13, doi: 10.1111/jse.12287.
105. Altstein, A. D., and Efimov, A. V. (1988) Physico-chemical basis of the genetic code origin: stereochemical analysis of interactions of amino acids and nucleotides based on the progene hypothesis, *Mol. Biol. (Mosk)*, **22**, 1411–1429.
106. Fox, G. E. (2010) Origin and evolution of the ribosome, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a003483, doi: 10.1101/cshperspect.a003483.
107. Altstein, A. D. (2015) The progene hypothesis: the nucleoprotein world and how life began, *Biol. Direct*, **10**, 67, doi: 10.1186/s13062-015-0096-z.
108. Lambowitz, A. M., and Zimmerly, S. (2011) Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a003616, doi: 10.1101/cshperspect.a003616.
109. Kunin, V. (2000) A system of two polymerases – a model for the origin of life, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **30**, 459–466, doi: 10.1023/a:1006672126867.
110. Альтштейн А. Д., Каверин Н. Н. (1980) О происхождении вирусных генетических систем, *Журн. Всесоюз. хим. общ. им. Д.И. Менделеева*, **25**, 383–390.
111. Альтштейн А. Д. (1987) Происхождение генетической системы: гипотеза прогенов, *Мол. Биол.*, **21**, 309–321.
112. Li, L., Francklyn, C., and Carter, C. W., Jr. (2013) Aminoacylating urzymes challenge the RNA world hypothesis, *J. Biol. Chem.*, **288**, 26856–26863, doi: 10.1074/jbc.M113.496125.
113. Rodin, A. S., Rodin, S. N., and Carter, C. W., Jr. (2009) On primordial sense-antisense coding, *J. Mol. Evol.*, **69**, 555–567, doi: 10.1007/s00239-009-9288-4.
114. Carter, C. W., Jr., and Kraut, J. (1974) A proposed model for interaction of polypeptides with RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 283–287, doi: 10.1073/pnas.71.2.283.
115. Carter, C. W. (2015) What RNA world? Why a peptide/RNA partnership merits renewed experimental attention, *Life (Basel)*, **5**, 294–320, doi: 10.3390/life5010294.
116. Koonin, E. V. (2011) *The Logic of Chance: The Nature and Origin of Biological Evolution*, FT Press.
117. Ikehara, K. (2002) Origins of gene, genetic code, protein and life: comprehensive view of life systems from a GNC-SNS primitive genetic code hypothesis, *J. Biosci.*, **27**, 165–186, doi: 10.1007/BF02703773.
118. Ikehara, K. (2005) Possible steps to the emergence of life: the [GADV]-protein world hypothesis, *Chem. Record*, **5**, 107–118, doi: 10.1002/tcr.20037.
119. Ikehara, K., Omori, Y., Arai, R., and Hirose, A. (2002) A novel theory on the origin of the genetic code: a GNC-SNS hypothesis, *J. Mol. Evol.*, **54**, 530–538, doi: 10.1007/s00239-001-0053-6.
120. Trifonov, E. N. (2004) The triplet code from first principles, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **22**, 1–11, doi: 10.1080/07391102.2004.10506975.
121. Ikehara, K. (2014) [GADV]-protein world hypothesis on the origin of life, *Orig. Life Evol.*, **44**, 299–302, doi: 10.1007/s11084-014-9383-4.
122. Segre, D., Ben-Eli, D., Deamer, D. W., and Lancet, D. (2001) The lipid world, *Orig. Life Evol.*, **31**, 119–145, doi: 10.1023/a:1006746807104.
123. Mallik, S., and Kundu, S. (2012) The lipid–RNA world, arXiv preprint arXiv:1211.0413.
124. Lancet, D., Zidovetzki, R., and Markovitch, O. (2018) Systems protobiology: origin of life in lipid catalytic networks, *J. R. Soc. Interface*, **15**, doi: 10.1098/rsif.2018.0159.
125. Krebs, J. E., Goldstein, E. S., and Kilpatrick, S. T. (2017) *Lewin's genes XII*, Jones & Bartlett Learning.
126. Miller, S. L., Schopf, J. W., and Lazcano, A. (1997) Oparin's "Origin of Life": sixty years later, *J. Mol. Evol.*, **44**, 351–353.

THE ORIGIN OF THE GENETIC CODE AND TRANSLATION WITHIN CURRENT CONCEPTS OF THE ORIGIN OF LIFE

Review

L. G. Kondratyeva¹, M. S. Dyachkova², and A. V. Galchenko^{3*}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, 119991 Moscow, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia; e-mail: gav.jina@gmail.com

The origin of the genetic code and translation system is perhaps the central and the most difficult problem in studying the origin of life and one of the most difficult in evolutionary biology at all. There are plenty of hypotheses for the emergence and development of present genetic systems, considering the origin and early evolution of the genetic code, as well as the emergence of replication and translation. The most famous hypotheses are discussed in this review. However, none of these hypotheses describes without gaps and assumptions all stages of the early evolution of genetic systems. The RNA-world hypothesis is the dominant scientific idea of the early evolution of biological and pre biological objects for now. Its main advantage is that it offers RNA as the first living systems to be self-sufficient. Namely, RNA are capable of functioning as a catalytic component of the system, and at the same time as a template. However, there are also significant limitations. In particular, ribozyme processive polymerase has not yet been discovered or synthesized. Taking into account the proteins and nucleic acids mutual need in each other in the present world, many authors propose scenarios of early evolution based on the co-evolution of these two classes of organic molecules. Hypotheses of this kind postulate that the emergence of translation was necessary for the replication of nucleic acids, in contrast to the world of RNA, where the emergence of translation was preceded by the era of self-replicating RNA. And although such scenarios are less economical from the point of view of the evolution, since they require the simultaneous emergence and evolution of two classes of organic molecules, as well as synchronization of replication and translation emergence, their great advantage is that they offer the development of a processive and much more accurate protein-dependent replication.

Keywords: evolution, origin of life, translation, genetic code, RNA world, progene, protein world, lipid world

УДК 575.112

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МАННОЗНОГО РЕЦЕПТОРА CD206 В СРАВНЕНИИ С МОДЕЛЬНЫМ ЛЕКТИНОМ КОНКАНАВАЛИНОМ А

© 2022 И.Д. Злотников, Е.В. Кудряшова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: helenakoudriachova@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.08.2021

После доработки 07.12.2021

Принята к публикации 16.12.2021

С использованием методов молекулярной динамики и нейросетевого анализа впервые проведено компьютерное моделирование комплексообразования моно- и олигосахаридных лигандов с основным (четвёртым) углеводсвязывающим доменом маннозного рецептора CD206 (CRD4), а также с модельным рецептором конканавалином А (ConA). Показано, что ConA является релевантной моделью CD206 (CRD4) вследствие сходства структурной организации сайтов связывания и высокой корреляции значений свободных энергий комплексообразования $r > 0,9$, согласно литературным данным и компьютерному моделированию. Обсуждается роль основных факторов, влияющих на аффинность взаимодействий лиганд–рецептор: количество и природа углеводных остатков, наличие Me-группы в O1-положении, тип гликозидной связи в диманнозе. Показано, что комплексообразование ConA и CD206 с лигандами энергетически обусловлено электростатическими взаимодействиями заряженных остатков (Asn, Asp, Arg) с атомами кислорода и водорода в углеводах; меньший вклад вносит гидрофобная и ван-дер-ваальсова составляющая. Рассмотрен возможный вариант дополнительной стабилизации комплексов за счёт СН-π стекинг-взаимодействий Туг с плоскостью Man-остатка. Изучена роль ионов кальция и марганца в процессах связывания лигандов. Рассчитанные в ходе молекулярной динамики свободные энергии комплексообразования коррелируют с экспериментальными данными (опубликованными для модельного ConA): коэффициент корреляции $r = 0,68$. Проведено обучение нейросети Раfнису на основе набора комплексов лиганд–рецептор PDBbind2020, что позволило увеличить точность предсказаний энергий до $r = 0,8$ и $0,82$ для рецепторов CD206 и ConA соответственно. Предложена модель нормирования значений энергий комплексообразования для вычисления релевантных значений ΔG_{bind} и K_d . На основе разработанной методики определены значения констант диссоциации серии комплексов CD206 с 9 углеводными лигандами различной структуры, ранее не охарактеризованными. Полученные данные открывают перспективы применения компьютерного моделирования для разработки оптимальных носителей лекарств с функцией активного нацеливания на макрофаги, а также определяют границы применимости использования ConA в качестве релевантной модели для исследования параметров связывания CD206 с различными углеводными лигандами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярная динамика, искусственная нейросеть, CD206, конканавалин А, макрофаги.

DOI: 10.31857/S0320972522010055

ВВЕДЕНИЕ

В представленной работе исследованы возможности метода молекулярной динамики и искусственной нейросети Раfнису [1] для выявления закономерностей в комплексообразовании

маннозного (Man) рецептора макрофагов (МФ) с углеводными лигандами, что необходимо для конструирования носителей лекарств с функцией адресного нацеленного на маннозные рецепторы (MP) макрофага.

Важной задачей для создания эффективных методик лечения различных заболеваний, в том числе болезней дыхательных путей, является не только разработка новых лекарственных средств, но и их направленная доставка к пораженным тканям и клеткам [2]. Целевым объектом могут служить МФ, которые играют важную роль в иммунном ответе за счёт распознавания и уничтожения патогенов [3]. В то же время МФ могут служить резервуаром для роста и размножения бактерий и вирусов, чем сильно ограни-

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; MP – маннозный рецептор; МФ – макрофаги; НС – нейросеть; ConA – конканавалин А; CRD – углеводраспознающий домен; diMan – α -D-маннопиранозил- α -D-манноза; E – электростатические взаимодействия; Man – манноза; MeMan – метил- α -D-маннопиранозид; NP – неполярная сольватация; P – полярная сольватация; triMan – триманнозид; vdW – ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

* Адресат для корреспонденции.

чивают эффективность антибиотико- и антивирусной терапии [4–5]. Антигенпрезентирующие клетки, в том числе МФ, вносят главный вклад в создание иммуносупрессивного микроокружения опухолей, при этом снижают иммунный ответ [6]. Перспективный путь решения этой проблемы – реполяризация иммуносупрессорных опухоль-ассоциированных макрофагов (M2) в провоспалительные (M1) [7]. Напротив, избыточная провоспалительная активность макрофагов является причиной аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, остеоартрит, рассеянный склероз). Специфическая активация макрофагов предполагается эффективным инструментом для лечения нейродегенеративных заболеваний [8]. Исходя из вышеперечисленного, адресная доставка в макрофаги антибактериальных препаратов или веществ, способных регулировать статус активации МФ в зависимости от задач лечения [9], представляется перспективным подходом для повышения эффективности лекарственной терапии различных заболеваний.

Воздействовать на макрофаги потенциально возможно с помощью связывания биоактивных молекул с рецепторами распознавания образов (pattern recognition receptors), включающими toll-подобные рецепторы (связывают гликолипиды, липополисахариды, липотейхоевые кислоты, пептидогликаны), рецепторы комплемента (распознают опсонизирующие фрагменты C3b, iC3b и C3dg), рецепторы-мусорщики (распознают глико- и липопротеины) и лектиновые рецепторы [3]. Воздействие на последние при таргетировании макрофагов позволяет активировать целевые ветви Т-хелперных лимфоцитов, Th1, Th2 или Th17 [10–11].

Примечательно, что нацеливание на МФ через задействование маннозных рецепторов, которые распознают Man-, Fuc- и GlcNAc-остатки олигосахаридов клеточной стенки патогенных микроорганизмов [12], имеет ряд преимуществ в сравнении со стратегией таргетирования иных рецепторов: воздействие только на болезнетворные макрофаги, снижение риска резистентности и осложнений и повышенная эффективность (<https://www.macrophagetx.com>). Основным маннозным рецептором МФ является CD206 – лектин С-типа, который представляет собой трансмембранный белок (175 кДа). С-Концевая часть CD206 содержит короткую (45 а.о.) цитоплазматическую часть [3]. Связывание углеводов МР происходит за счёт лектиноподобного участка С-типа, состоящего из 8 доменов. Однако способность связывать углеводы изолированно от других частей доказана только для четвёртого углеводраспознающего

домена (CRD4) [13–14]. Поэтому в данной работе для моделирования свойств МР и выявления наиболее специфичных маннозных лигандов использовался CRD4. Следует отметить, что, по результатам экспериментальных данных [15], параметры связывания олигосахаридов парой доменов CRD(4–5) во многом совпадают с таковыми для целого МР CD206, что показано на примере олигосахарида Man23 (23 маннозных остатка в молекуле).

Однако, поскольку сами МР труднодоступны, а экспериментальных данных по комплексам CD206 в литературе крайне мало, для определения основных тенденций в связывании маннозных лигандов часто используются модельные белки-рецепторы. Предполагается, что CD206 демонстрирует высокое сходство с конканавалином А (ConA) в закономерностях связывания углеводов [3]. Одной из задач данной работы является сравнение указанных рецепторов для выявления границ применимости ConA в качестве модели МР. ConA состоит из четырёх субъединиц (26,5 кДа, 237 а.о. каждая), сильно гликирован, связывает углеводы в присутствии катионов металлов (обычно Mn^{2+} и Ca^{2+}) [16–17]. Катион Ca^{2+} координирует аминокислотные остатки и «подготавливает» рецептор к распознаванию углеводов: Ca^{2+} в CD206, в отличие от конканавалина А, участвует в непосредственном комплексообразовании с лигандом. В сайте ConA присутствует второй катион, в данном случае Mn^{2+} (иногда встречается Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), который фиксирует положение Ca^{2+} , снижая подвижность аминокислотных остатков в сайте связывания. Включение обоих катионов в ConA необходимо для активирования связывающей способности белка [18–19].

Поиск высокоаффинных взаимодействий лиганд–рецептор может быть выполнен с помощью различных физико-химических методов [20]: изотермическая калориметрия титрования [21–22], флуоресцентные методы [23–24], ИК-спектроскопия Фурье [25], метод ингибирования Ландштейнера [26]. Применяются также проточная цитометрия для определения экспрессии антигенов МФ и путей их активации [27], конфокальная микроскопия для визуализации клеточного поглощения носителей лекарств [28]. Активно развивающимся методом является компьютерное моделирование. Молекулярная динамика (МД) и искусственные нейросети (НС) позволяют моделировать разнообразные химические процессы, включая лиганд-рецепторные взаимодействия. Методы *in silico* делают возможным изучение широкого круга соединений с вариабельной структурой и пространственной организацией, синтез которых в

лаборатории является трудоёмким, требует значительных временных затрат и, зачастую, не всегда возможен.

МД позволяет изучать механизмы взаимодействия белков-рецепторов с лигандами: пути протекания [29–31] и кинетику процессов диссоциации комплексов [32], а также связывание лигандов с рецептором [33–35]. МД даёт возможность оценить параметры комплексообразования: свободную энергию взаимодействия, вклад водородных связей, ван-дер-ваальсовых (vdW) и электростатических (E) взаимодействий, энергии растворения и десольватации [33, 36–37]. МД является хорошим инструментом для изучения и уточнения кристаллических структур белков и их комплексов, а именно: моделирование выявляет значимые взаимодействия лиганд–рецептор, которые отсутствуют в кристалле [34]. МД выявляет взаимосвязь гидрофобности/гидрофильности лиганда, его формы (вытянутая, Т-образная, изогнутая) со стабильностью комплекса и кинетикой связывания [38]. Однако МД-подход требует значительных вычислительных мощностей и времени моделирования, что обоснованно в случаях, когда важно выявление механизма взаимодействия исследуемых молекул. В то же время для проведения высокопродуктивного скрининга широкого круга лигандов комплементарным методом (или заменой МД) оценки сродства лигандов к рецептору является искусственная нейросеть.

Известно несколько нейросетей, предсказывающих константы диссоциации (ассоциации) комплексов лиганд–рецептор или константы ингибирования на основе базы данных PDBbind: SE-OnionNet [39], Pafnucy [1], Nnscore 2.0 [40]. Главное преимущество нейросетей перед МД – малое время работы (несколько минут против дней-недель моделирования), а также альтернативный принцип работы НС, который заключается в «сравнении» данной пары лиганд–рецептор с известными из литературных данных (PDBbind) по целому ряду (в данной работе по 19) параметров, включая типы составляющих атомов, валентности, гибридизации, заряды. Точность предсказания аффинности зависит от «обученности» сети, количества слоёв и нейронов в сети и сложности алгоритма. Стоит отметить, что компьютерные методы активно совершенствуются, что открывает перспективы использования МД и НС как значимых инструментов в биохимии.

В последнее время в литературе появился ряд работ, ярко демонстрирующих потенциал нейросетей. Так, в работе Lahey и Rowley [41] с использованием НС предсказана стабильность молекулярных конформаций с точностью, со-

поставимой с квантово-химическими расчётами, при значительном снижении вычислительных затрат симуляции лиганд–рецепторных взаимодействий (например, фосфодиэстераза 5А с тадалафилом). НС способна предсказывать положение рецептора и лиганда при связывании, а также величины энергии Гиббса (с большей корреляцией с экспериментальными данными) для ряда биомолекул, например, биотин карбоксилаза, дегидрофолат редуктаза [42]. С помощью НС и технологий искусственного интеллекта выполнен поиск потенциальных лекарств среди используемых в медицине или проходящих клинические испытания: фалдапревир – гепатит С, иммунодепрессант циклоспорин, ремдисевир, мефупариб и другие. Данные терапевтические агенты могут быть перепрофилированы для снижения вирусной нагрузки, облегчения симптомов COVID-19 и эффективного лечения вирусной инфекции [43].

Однако методы *in silico*, в том числе технология нейросетей, для исследований непосредственно биосистем только начинают использоваться учёными. В то же время значительный потенциал компьютерного моделирования уже продемонстрирован в ряде работ [44–46]. Поэтому одной из задач данной работы является демонстрация перспективности использования НС, а также МД для изучения лиганд–рецепторных взаимодействий моно- и олигосахаридов с CRD4 маннозного рецептора CD206, а также с модельным лектином конканавалином А. Для ряда комплексов ConA–лиганд в литературе определены экспериментальные константы, что позволило валидировать и оптимизировать методику моделирования и на этой основе изучить взаимодействия серии лигандов с четвёртым углеводсвязывающим доменом (CRD4) маннозного рецептора CD206, для которого параметры комплексов ранее не были описаны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Структуры комплексов. Пространственные структуры молекул рецептора ConA и 15 углеводных лигандов были построены с использованием кристаллографических данных PDB (таблица). Варьировали структуру и пространственную организацию лигандов **1–15**: тип углеводных остатков, количество Man- и GlcNAc-остатков в углеводе (от 1 до 5), наличие Me-группы в O1-положении углеводов, тип гликозидной связи ($\alpha 1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 6$). Рассмотрены 4 субъединицы белка по 237 а.о. каждая, катионы Ca^{2+} и Mn^{2+} в сайтах связывания лигандов, кристал-

логографическая вода. Структура четвёртого углеводсвязывающего домена маннозного рецептора CD206 построена на основе кристаллографических данных PDB (Асс. No. 7JUF). Рецептор состоит из 135 а.о. и катиона Ca^{2+} . Для Ca^{2+} и Mn^{2+} использовали несвязанную модель 12-6-4 потенциала Леннарда–Джонса. Структуры лигандов к CD206 сгенерированы и подведены к сайту связывания вручную с применением средства визуализации PyMol (<https://pymol.org/2/>) (таблица).

Структуры подготовлены с использованием tLeaP из AmberTools20, 21 [47]: добавлены недостающие атомы водорода, ионы Na^+ для нейтрализации общего заряда комплекса. Система была сольватирована молекулами воды TIP3P [48] с минимальным расстоянием между границей ячейки и белком 10 Å. В среднем размер ячейки с тетрамером ConA составлял $90 \times 95 \times 90 \text{ Å}^3$ с доменом CD206 $60 \times 65 \times 60 \text{ Å}^3$. Силовые поля Amber ff14SBonlysc, GLYCAM_06j1 использовались для описания взаимодействий атомов.

Проведение молекулярной динамики. Моделирование проводилось с использованием пакета молекулярной динамики Amber20. Системы (комплексы рецепторов с лигандами) в водном растворе сначала были минимизированы с использованием 5000 шагов алгоритма наискорейшего спуска с последующими 5000 шагами сопряжённого градиентного алгоритма. Систему нагревали от 0 до 300 К в течение 0,1 нс по модели Ланжевена с использованием частоты столкновений $2,0 \text{ пс}^{-1}$ и при периодических граничных условиях постоянного объёма. Затем была проведена симуляция 100 пс с постоянным давлением 1 атм. Далее – уравнивание системы в течение 100 пс и непосредственно МД (production). Для каждой модели выполнено три независимых цикла с поддержанием температуры на уровне 300 К термостатом Ланжевена ($\text{ntt} = 3$). В случае тетрамера ConA проводилась МД 10 нс (cut-off 8 Å, шаг 2 фс). Моделирование четвёртого домена MP CD206 проводили 50–250 нс (cut-off 8 Å, шаг 2 фс). Увеличение длительности моделирования для маннозного рецептора обусловлено неточностью начальных координат, в некоторых случаях снижение шага до 0,5–1,0 фс предпринято во избежание технических ошибок. Все связи, содержащие атомы водорода, были ограничены алгоритмом SHAKE [49].

Анализ траекторий и топологических файлов комплексов. Анализ траекторий выполнен с помощью MMPBSA.py [50] и cpptraj [51]. Расчёт энергий комплексообразования проведён на основе равновесной (заключительной) части тра-

ектории 3–5 нс при концентрации соли 1,0 М для минимизации неспецифических электростатических взаимодействий с использованием моделей generalized born и Пуассона–Больцмана.

Нейросетевой анализ комплексов. Выбор нейросети Pafnucy [1] обусловлен её лидирующей позицией в рейтинге алгоритмов по предсказыванию аффинностей рецептор–лиганд (CASF-2016). С помощью HC Pafnucy анализировались все пространственные структуры комплексов рецептор–лиганд, полученные после проведения МД. В качестве входных файлов использовались структуры, усреднённые по 30 фреймам заключительной части траектории (ConA), а также единичные структуры из траектории, минимизированные с использованием 10 000 шагов алгоритма наискорейшего спуска с последующими 10 000 шагами сопряжённого градиентного алгоритма (CD206). С помощью rpreare.py подготовлен набор из 30 комплексов (по 15 на рецептор) в формате hdf.

Использованы 2 конфигурации нейросети Pafnucy: 1) исходная HC, обученная на основе PDBbind2016 [<https://gitlab.com/cheminflBB/pafnucy>; <http://www.pdbbind.org.cn/index.php>]; 2) нейросеть на основе п.1, с обучающим набором на основе PDBbind2020, включая 14 107 комплексов в general set, 5109 – validation, 226 – core set. Подготовлена авторами настоящей статьи с использованием pdbbind data.ipynb и скриптов split_dataset.py, training.py. Обучение проводилось с параметрами, установленными по умолчанию, кроме числа циклов (эпох) равного 25 (рис. S1, табл. S1 в Приложении). Ошибка проверки (validation error) снижается примерно до пятой эпохи, далее оптимизируется точность только для обучающей выборки.

HC предсказывает значение K_d или K_i на основе анализа 19 характеристик атомов: тип атома (В, С, N, О, Р, S, Se, галоген или металл (9 вариантов)), гибридизация и валентность (3 варианта), связи с тяжёлыми или гетероатомами, дополнительные параметры (гидрофобность, ароматичность, акцепторные/донорные свойства, входит в состав цикла), частичный заряд и принадлежность атома рецептору (–1) или лиганду (1).

Математическая обработка данных. Значения свободных энергий рассчитаны на основе трёх независимых циклов моделирования путём усреднения, для ConA-тетрамера расчёты проведены по четырём субъединицам и затем усреднены. Нормирование полученных данных на экспериментальные проводили по уравнению: $\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{bind (исх)}} k + b$ (ккал/моль). В случае ConA: $k = 0,1125$ и $b = 2,07$ ($R^2 = 0,71$) по методу Пуассона–Больцмана для МД; $k = 2,1961$ и

$b = -9,05$ ($R^2 = 0,67$) – оптимизация нейросети. Для CRD4 CD206 использовались коэффициенты: $k = 0,0137$ и $b = 2,99$ ($R^2 = 0,47$) по методу Пуассона–Больцмана МД; $k = 0,3855$ и $b = 1,33$ ($R^2 = 0,78$) – НС. Более высокая корреляция данных НС по рецептору ConA достигнута при нормировании не энергий, а констант: $K_d = 8,24 \cdot K_{d(\text{исх})} + 10^{-5}$ (М).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Энергетические характеристики комплексообразования ConA и домена CD206 с углеводными лигандами. Для определения параметров лиганда, увеличивающих сродство к маннозным рецепторам, проведено моделирование взаимодействия углеводов, состоящих из Man-, Gal-, Glc-, Fuc- или GlcNAc-остатков (рис. 1, таблица, табл. S2 и S3 в Приложении). Релевантность определённых в ходе моделирования значений констант и свободных энергий подтверждена путём сравнения с литературными данными

для ConA, полученными методом изотермической калориметрии [21], и для домена MP CD206 по сдвигам в спектрах ЯМР [52–53] и конкурентному связыванию (рис. 1) [13]. Абсолютные значения свободных энергий ожидаемо не совпадают, однако прослеживается достаточная высокая для методов *in silico* степень корреляции, что визуально можно определить из сходства зависимостей свободных энергий (рис. 1). Коэффициент корреляции Пирсона с литературными данными $r = 0,82$ для ConA и $r = 0,58$ для CD206, что достаточно с учётом малой изученности маннозного рецептора. Причём наиболее приближёнными к экспериментальным оказались значения, полученные в ходе нейросетевого анализа комплексов рецептор–лиганд после МД. CD206 практически невозможно получить в виде, пригодном для скрининга *in vitro*, а следовательно, компьютерные методы применительно к данным системам обладают значительным потенциалом.

Отметим, что экспериментальные литературные данные по комплексообразованию MP

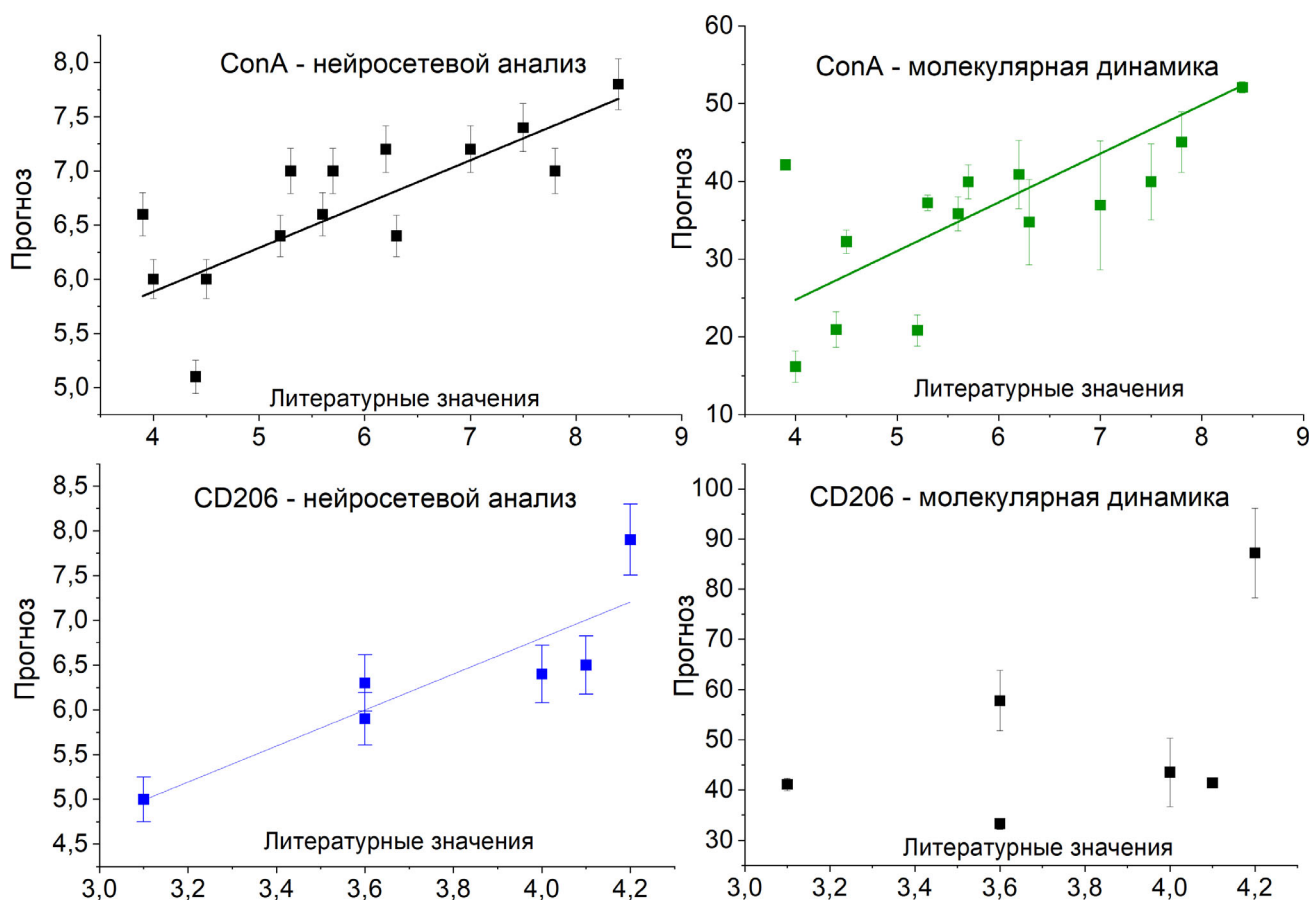


Рис. 1. Энергии комплексообразования ConA и домена маннозного рецептора CRD4 CD206 с углеводными лигандами, рассчитанные с помощью компьютерного моделирования, в сравнении с литературными данными [13, 20, 21, 26, 52, 53]. Для ConA представлены усреднённые по субъединицам значения. Т = 300 К. рН = 7. Концентрация NaCl – 1М

Константы диссоциации комплексов ConA и домена маннозного рецептора CRD4 CD206 с углеводными лигандами

Номер	Название лиганда, код PDB комплекса с ConA и номер иллюстрации	K_d (ConA–лиганд), мкМ			$*K_d$ (CD206 CRD4–лиганд), мкМ		
		Молекулярная динамика	Лит. данные	Нейросеть	Молекулярная динамика	Лит. данные	Нейросеть
1	α -маннопираноза [5CNA]; рис. 5 и рис. S5 в Приложении	1450	1100	360	3450	—	3700
2	Me-маннопиранозид [5CNA]; рис. 5, 7, и рис. S3, S5 в Приложении	600	160	190	2900	2400	2360
3	Me- $\alpha(1\rightarrow2)$ -диманнопиранозид [1BXH]; рис. 4	30	7	60	1700	—	20
4	$\alpha(1\rightarrow2)$ -диманнопиранозид [1BXH]; рис. S4 в Приложении	43	24	190	2290	1280	1700
5	Me- $\alpha(1\rightarrow3)$ -диманнопиранозид [1QDO/C]; рис. 4	14	30	56	1800	—	2860
6	$\alpha(1\rightarrow3)$ -диманнопиранозид; рис. S4 в Приложении	16	71	78	1600	2290	1800
7	$\alpha(1\rightarrow6)$ -диманнопиранозид; рис. S4, S7 в Приложении	35	75	145	2400	1010	1600
8	Me- $\alpha(1\rightarrow6)$ -диманнопиранозид; рис. 4, рис. S2 в Приложении	27	120	80	1500	—	1500
9	Me-3,6-ди-O-(маннопиранозил)- α -маннопиранозид [1ONA]	6	2	70	1080	—	2860
10	3,6-ди-O-(маннопиранозил)- α -маннопираноза; рис. 2	16	3	40	780	—	650
11	3,6-ди-O-($\beta(1\rightarrow2)$ -N-ацетилглюкозамин-маннопиранозил)- α -маннопираноза [1TEI]; рис. S6 в Приложении	2	0,7	30	480	—	1000
12	Me- α -глюкопиранозид [1GIC]; рис. S2 в Приложении	590	560	200	>6000*	>6000*	>6000*
13	Me- α -галактопиранозид [1GIC]; рис. 3, рис. S2 в Приложении	70	500	370	>6000*	>6000*	>6000*
14	Me-GlcNAc	11	1350	150	2400	5300	4200
15	Fuc- $\alpha(1\rightarrow3)$ -GlcNAc	3	—	170	2300	—	1400

Примечание. Значения рассчитаны с помощью компьютерного моделирования, в сравнении с литературными данными по методам изотермической калориметрии [21] и ингибированию Ландштейнера [26], а также рассчитанные по сдвигам в спектрах ЯМР [52–53] и конкурентному связыванию [13]. T = 300 K. pH = 7. Концентрация NaCl – 1M.

* Неспецифическое взаимодействие.

описаны лишь для ограниченного круга лигандов: по ЯМР-сдвигам и конкурентному связыванию [13, 52, 53] – 4 из 15 рассмотренных в данной работе. Компьютерное моделирование CD206 или его углеводсвязывающего домена ранее не проводилось, кроме работы Ascianto et al. [54], в которой изучалась часть MP CysRD-CTLD2/3 (домены, которые не играют важной роли в связывании углеводов [55]). Для домена маннозного рецептора CD206

(CRD4) нами рассчитаны 9 значений констант, ранее не опубликованных в статьях.

Роль МД в оптимизации структуры комплексов. Несмотря на то что для 9 комплексов ConA и 4 комплексов CD206 с лигандами в качестве исходных координат использовались структуры из PDB, компьютерное моделирование даже таких систем позволяет значительно оптимизировать пространственное расположение рецептора и лиганда. Экспериментальное определение

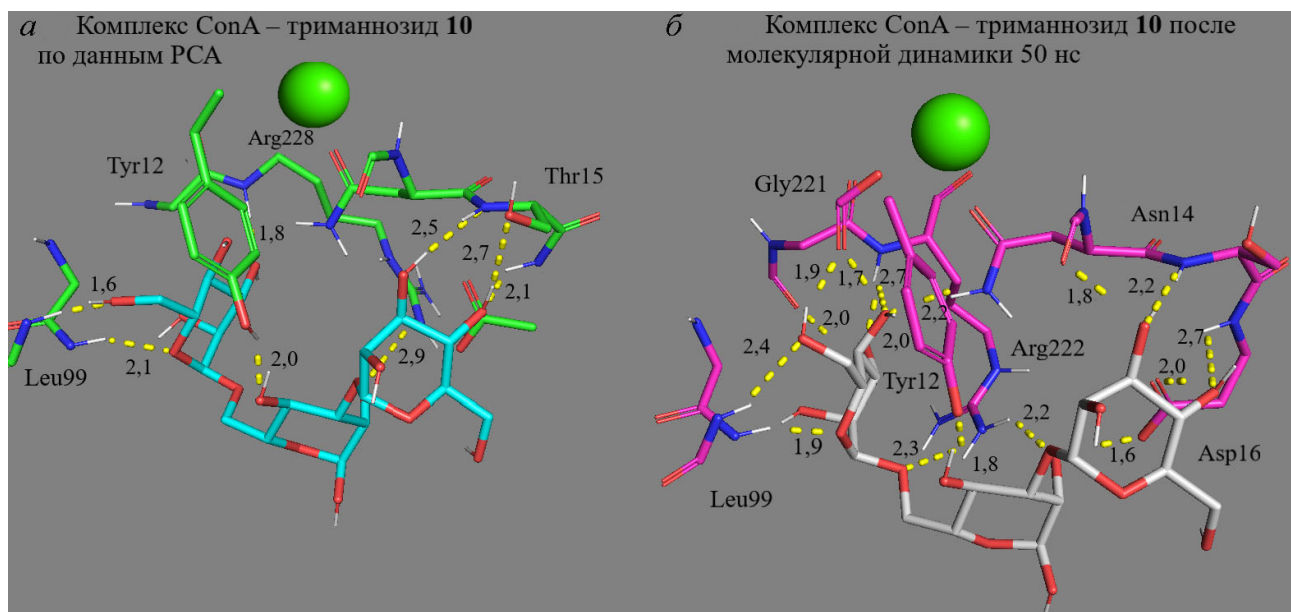


Рис. 2. Поиск оптимального положения лиганда с помощью молекулярной динамики. Показаны комплексы ConA – триманнозид **10** по данным PCA (а) и после молекулярной динамики 50 нс (б). Зелёный шар – Ca^{2+}

структур комплексов проводится методом рентгеноструктурного анализа (РСА) кристалла [56]. Однако данный метод имеет определенные ограничения, связанные с несоответствием условий кристаллизации белка с лигандом и проведением экспериментов по комплексообразованию, неопределённостью положений атомов водорода [57] и различием структур рецептора в растворе и в кристалле. Метод МД позволяет устранить эти недостатки и выявить значимые взаимодействия лиганд–рецептор, которые отсутствуют в кристалле [34]. Роль МД в оптимизации структуры комплекса белок–лиганд продемонстрирована на рис. 2, где сопоставлены положения триманнозида **10** в комплексе с ConA по данным PCA и после моделирования 50 нс. При связывании с рецептором триманноза **10** (рис. 2) взаимодействует центральным Ман-остатком с Arg222 (3 значимые водородные связи 1,8–2,3 Å). Левый ($\alpha 1 \rightarrow 6$) Ман-остаток координируется большим числом аминокислот, в том числе Asn14, Gly221 за счёт образования высокоэнергетических водородных связей атомов O4,5,6 (1,7–2,7 Å). Правый ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Ман-остаток сближается с Thr15 на 0,3 Å и Asp. С помощью моделирования показано более энергетически выгодное положение лиганда в сайте связывания относительно комплекса PDB (1ONA).

ConA имеет сходные с CD206 мотивы структуры углеводсвязывающего домена. Насколько структурное сходство транслируется в функциональное, показано далее. Механизм связывания

лигандов четвёртым доменом MP CD206 покажем на примере взаимодействия диманнозы **8** с рецептором (рис. S2 в Приложении). В исходном положении лиганд не образует водородных связей с аминокислотными остатками. В ходе моделирования наблюдается оптимизация пространственного расположения диманнозы: маннозный остаток $\alpha 1$ сближается с рецептором, происходит связывание с Glu107, Asn121, Hie127 (рис. S2 в Приложении). В то же время остаток $\alpha 6$ проворачивается вокруг гликозидной связи, чтобы образовать дополнительные взаимодействия с MP. Отметим, что при использовании в качестве исходного положения рецептора с вручную подведённым лигандом требуется увеличение времени моделирования в сравнении со случаем исходной PDB-структуры: от 10–30 нс до 50–250 нс. Из рис. S2 в Приложении следует, что 30 нс в первом случае недостаточно для оптимизации структуры комплекса. Необходимо не менее 100 нс МД.

Основные закономерности связывания углеводсодержащих лигандов CRD4 CD206 и модельным лектином ConA. На основании рассчитанных с помощью МД и НС констант диссоциации комплексов лиганд–рецептор (таблица, табл. S2 и S3 в Приложении) [58] и механизмов комплексообразования (рис. 2–5 и рис. S2–S8 в Приложении) можно выявить следующие закономерности. По данным МД, наиболее низкие значения констант диссоциации характерны для комплексов рецепторов с биантенными лигандами **9–11** и **15**: K_d (ConA – $(\text{GlcNAc})_2$ –

triMan) = 2 мкМ, K_d (ConA – Fuc- α (1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc) = 3 мкМ. Аналогично домен маннозного рецептора образует наиболее прочные комплексы с лигандами **9–11** с K_d 1080, 780 и 480 мкМ соответственно.

Специфичность рецепторов к типу углеводного остатка. По данным нейросетевого анализа комплексов, сродство углеводных остатков к ConA возрастает в ряду (Gal $\approx$ Fuc) < (Glc $\approx$ Man) < GlcNAc, что коррелирует с литературными данными [20–21]. Несколько отличная закономерность характерна для четвертого домена MP CD206: аффинность к лигандам увеличивается в ряду (Glc $\approx$ Gal) < GlcNAc < (Fuc $\approx$ Man) (таблица). Отметим, что метилированные производные α -D-глюкозы **12** и галактозы **13** (рис. 3) крайне слабо взаимодействуют с MP, но более аффинно связываются с ConA (рис. S3 в Приложении). В ходе моделирования CD206 происходит выход лиганда (**12**, **13**) из сайта связывания и дальнейшее неспецифическое взаимодействие с боковыми аминокислотными остатками (рис. 3). Для остальных исследуемых лигандов наблюдается специфичное связывание в сайте распознавания углеводов.

Аффинность рецепторов к лигандам в зависимости от количества Ман-остатков. Углеводы, содержащие только одно маннопиранозильное кольцо (рис. S4 в Приложении) – Man **1** и MeMan **2** (метил- α -D-маннопиранозид), не обладают высокой аффинностью к ConA – необ-

ходима кластеризация бóльшего количества концевых Man/GlcNAc-остатков. Однако, по данным калориметрического титрования [21], гликопептиды Man7–9, которые моделируют олигосахариды клеточной стенки микроорганизмов, практически не превосходят в сродстве к ConA лиганд **11** (производное triMan – триманнозида), т.е. существует оптимальное количество углеводных остатков, задействованных в связывании. Иными словами, модельный лектин ConA имеет наибольшее сродство к консервативному ядру триманнозида, следовательно, достигнут предел специфичности лиганд–рецептор. В случае CRD4 с увеличением количества доступных Man-остатков, по данным МД и НС, сродство лигандов к MP растёт, однако менее выражено. Что также следует из данных, полученных методом конкурентного связывания в работе Feinberg et al. [13]: Man9 специфичнее MeMan более чем на порядок, а триманнозид – всего лишь в 3 раза специфичнее MeMan. Аффинность MP к маннозосодержащим лигандам возрастает, начиная от 1–2 остатков и вплоть до крупных олигосахаридов и полимеров (например, Man23, маннан) [15].

Влияние типа гликозидной связи в диманнозидах на сродство к рецептору. Рецептор ConA распознаёт диманнозиды **3–8** (рис. 4 и рис. S2 в Приложении) с аффинностью, возрастающей в ряду: α 1 $\rightarrow$ 2 < α 1 $\rightarrow$ 6 < Me- α 1 $\rightarrow$ 6 < α 1 $\rightarrow$ 3 << << Me- α 1 $\rightarrow$ 3 $\approx$ Me- α 1 $\rightarrow$ 2, в котором приведены

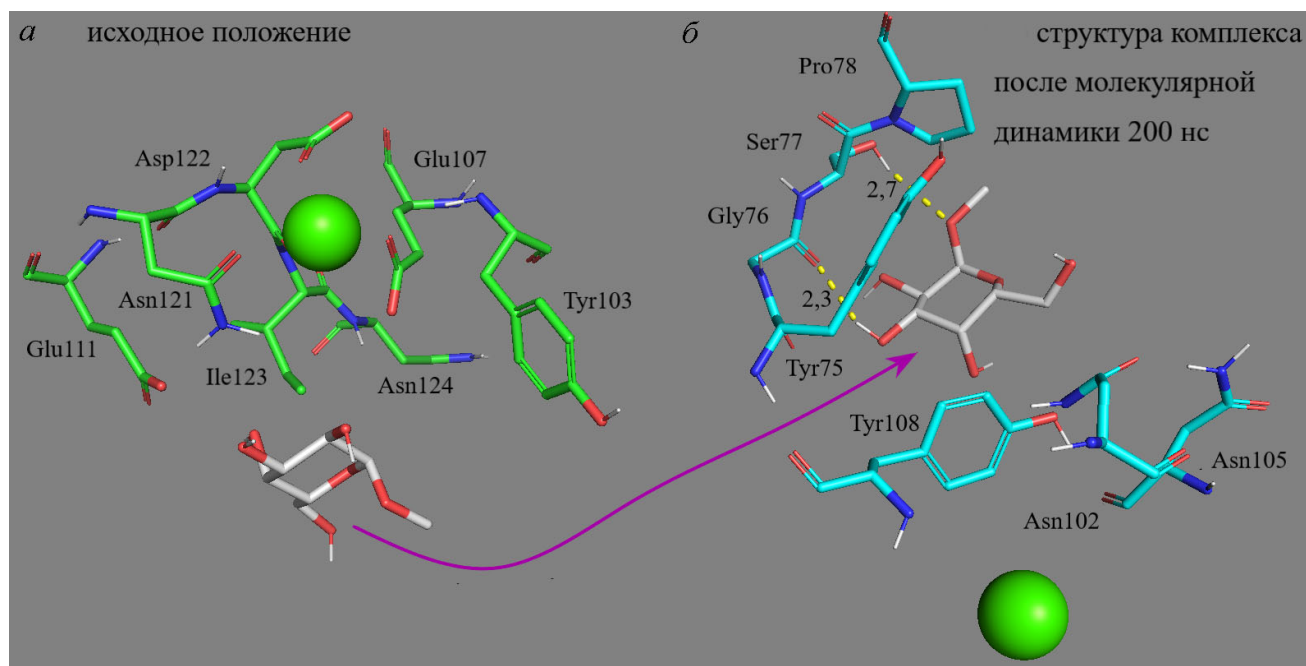


Рис. 3. Неспецифическое взаимодействие метил- α -D-галактопиранозида **13** (белый) с доменом маннозного рецептора CD206. *а* – Исходное положение. *б* – Структура комплекса после молекулярной динамики 200 нс. Зелёный шар – Ca^{2+}

условные обозначения диманнозидов и их метилированных производных (нейросеть, таблица). Таким образом, связь Ман-остатков через атомы кислорода у C1 и C2/3 оптимальная. Однако, исходя из структур комплексов, можно сделать вывод, что в случае $\alpha 1 \rightarrow 2$ и $\alpha 1 \rightarrow 6$ гликозидной связи в α -D-маннопиранозил- α -D-маннозе (diMan) достигается эффект вилки или биантенны, связывание бóльшим количеством атомов (рис. 4) и задействованы 2 Ман-остатка. Общие мотивы в комплексах diMan–ConA: остатки 0MA (терминальные маннопиранозиды) образуют водородные связи с Leu99, Tyr100, Asn14, Asp208, Arg228 – консервативные для большинства комплексов. Вклад в свободную энергию данных взаимодействий таков: Leu и Tyr – 3,95 и 2,45 ккал/моль (vdW, E, NP); Asn и Asp – 3,0 и 4,62 (E); Arg – 3,79 (P); где vdW – ван-дер-ваальсовы взаимодействия, E – электростатические, P – полярная сольватация и NP – неполярная сольватация. Однако для остатка 2MA (Ман с позицией для связи $\alpha 2$) наблюдаются различия в комплексах изомеров диманнозы с ConA. Так, в $\alpha 1 \rightarrow 3$ изомере (рис. 4) 2MA практически не задействован в связывании. В других изомерах реализуются водородные связи с Tyr12 (3,5 ккал/моль; E, NP), Asn14 и Thr15 (5,6 и 3,8 ккал/моль; vdW, E, NP), Asp16 (7,0 ккал/моль; E). Наиболее энергетически выгодные взаимодействия обусловлены электростатическим притяжением к остаткам Asp и Asn. Таким образом, $\alpha 1 \rightarrow 6$ гликозидная связь в diMan делает Ман-остатки дос-

тупными для рецептора и повышает аффинность.

Напротив, биантенным становится $\alpha 1 \rightarrow 2$ -диманнопиранозид при взаимодействии с CRD4 CD206 (рис. S5 в Приложении). При этом рецептор связывает второй Ман-остаток за счёт дополнительных взаимодействий Lys113 (3,3 ккал/моль; vdW, E, NP) и Glu111 (4,5 ккал/моль; E). По данным НС (таблица), аффинность МР к диманнозе 3 с $\alpha 1 \rightarrow 2$ гликозидной связью практически на 2 порядка выше, чем к диманнозам 6–7 с $\alpha 1 \rightarrow 3$ или $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Роль CH_3 -группы в O1-положении. Метилирование OH-групп у O1-атомов углеводов, по данным МД, увеличивает сродство к лектину ConA (рис. S6 в Приложении): в случае маннозы 1–2 – в 2,4 раза; диманнозы 3–4 – в 1,4 раза; диманнозы 5–6 – в 1,14 раза; диманнозы 7–8 – в 1,3 раза; триманнозидов 9–10 – в 2,7 раза соответственно. Для домена CD206 наблюдается похожая картина (рис. 5) для маннозы и $\alpha 1 \rightarrow 2$ и $\alpha 1 \rightarrow 6$ изомеров диманнозы, однако метилирование $\alpha 1 \rightarrow 3$ изомера и триманнозы приводит к снижению аффинности. Таким образом, метильная группа в олигосахаридах мешает связыванию с CD206, что хорошо согласуется с отсутствием таковой в гликанах микроорганизмов, которые распознаёт МР.

Интересен механизм увеличения аффинности моносахаридов к МР за счёт введения гидрофобной группы и блокировки O1-атома от потенциального образования водородных связей.

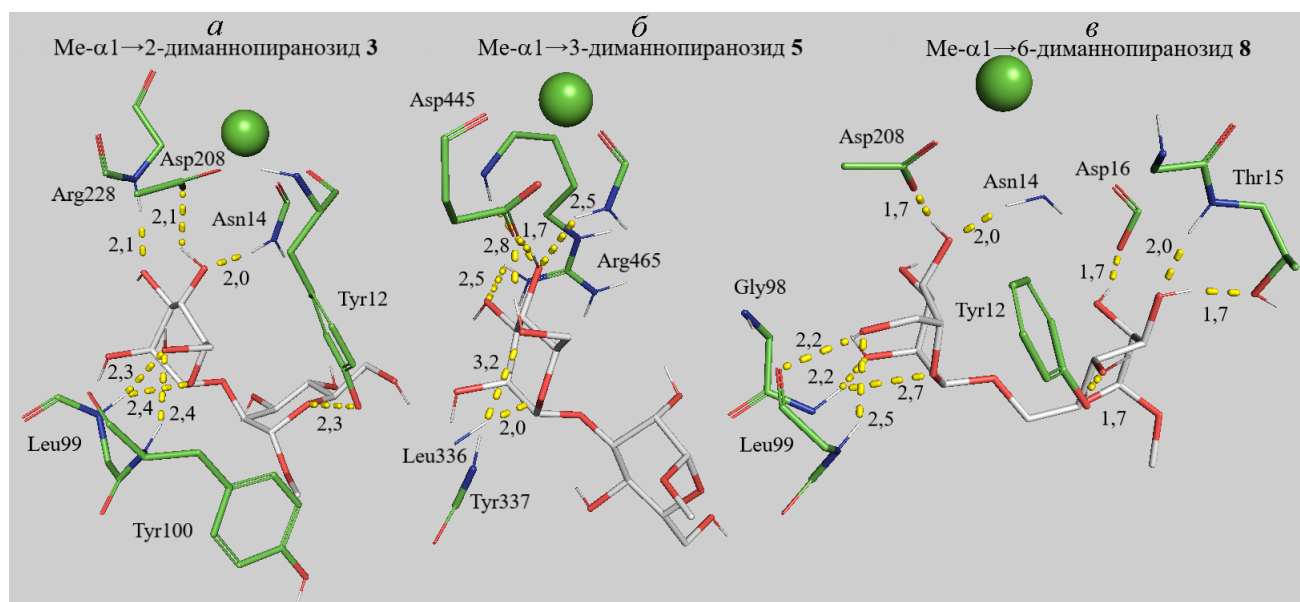


Рис. 4. Влияние типа гликозидной связи на связывание диманнозы (белый) ConA (зелёный). *а* – Me- $\alpha 1 \rightarrow 2$ -диманнопиранозид 3 – субъединица А. *б* – Me- $\alpha 1 \rightarrow 3$ -диманнопиранозид 5 – субъединица В. *в* – Me- $\alpha 1 \rightarrow 6$ -диманнопиранозид 8 – субъединица А. Зелёный шар – Ca^{2+} . Молекулярная динамика 10 нс

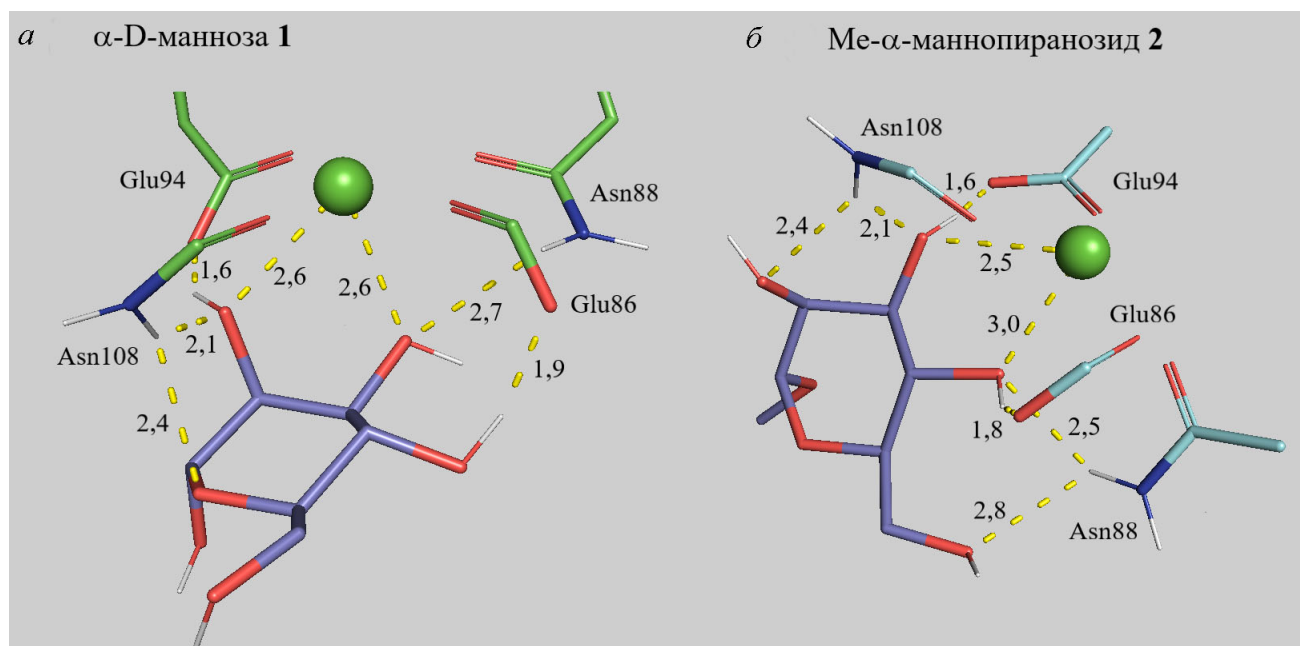


Рис. 5. Влияние метилирования атома O1 на связывание маннозы четвёртым доменом маннозного рецептора CD206. *а* – α-D-манноза **1**. *б* – Me-α-маннопиранозид **2**. Молекулярная динамика 200 нс

CH₃-группа непосредственно не участвует во взаимодействии с рецептором (рис. 5 и рис. S6 в Приложении), однако уменьшает возможность образования взаимодействий O1H-группы с рецептором, что приводит к изменению пространственной ориентации Man-остатка примерно на 90° и, соответственно, к оптимизации связывания маннозы аминокислотными остатками CD206, включая Asn108, Asn88 и Glu94, а также изменяется координация катионом кальция.

Мультивалентное связывание триманнозидов. Триманнозид является природным лигандом к ConA, консервативное ядро triMan в олигосахаридах высокоаффинно к рецептору [20, 21]. Рассмотрим связывание триманнозидов **9–11** (рис. S2 в Приложении) ConA: две плоскости маннопиранозильных остатков перпендикулярны, а третья наклонена примерно под углом 45° к центральной. В данном случае связывание происходит по «улучшенному механизму»: образуется в среднем 15 водородных связей и 5–9 дополнительно опосредованы водой. Сайт лектина расширяется: дополнительно к упомянутым выше задействованы следующие аминокислотные остатки: Asp16, Thr15, Pro13, Tyr12, Asp208. Это обуславливает прочность комплексов с ConA.

Введение терминальных GlcNAc-остатков к triMan приводит к взаимодействию с Thr226, Glu98, Arg228 и Gly224 (рис. S7 в Приложении).

Лиганд **11**, в котором к консервативному ядру триманнозида прикреплены через гликозидную связь β(1→2) два терминальных остатка GlcNAc, оказался самым специфичным к ConA и CD206 среди представленных: K_d (ConA – лиганд **11**) = 2 мкМ; K_d (CRD4 – лиганд **11**) = 480 мкМ.

Термодинамические параметры комплексообразования рецептор–лиганд. Декомпозиция энергии. Как обсуждалось выше, с увеличением количества Man- или GlcNAc-остатков сродство лигандов к ConA и CD206 увеличивается. Рассмотрены водородные связи, образующиеся в комплексе между аминокислотными остатками белка и лигандом. Их количество коррелирует с аффинностью взаимодействия, однако данный параметр не исчерпывающий. Необходимо дополнительно учитывать ван-дер-ваальсовы (vdW) и электростатические (E) взаимодействия, полярную (P) и неполярную (NP) сольватацию. Большое количество ароматических остатков (особенно Tyr) в сайтах связывания углеводов, по-видимому, облегчает связывание за счёт CH-π взаимодействий [59]: например, целлюлозо-синтаза, *Escherichia coli* β-galactosidase (PDB 1JZ8) [60].

Нами проведено разложение свободной энергии комплексообразования на 4 составляющие, указанные выше, для аминокислотных остатков, которые задействованы в связывании (рис. 6).

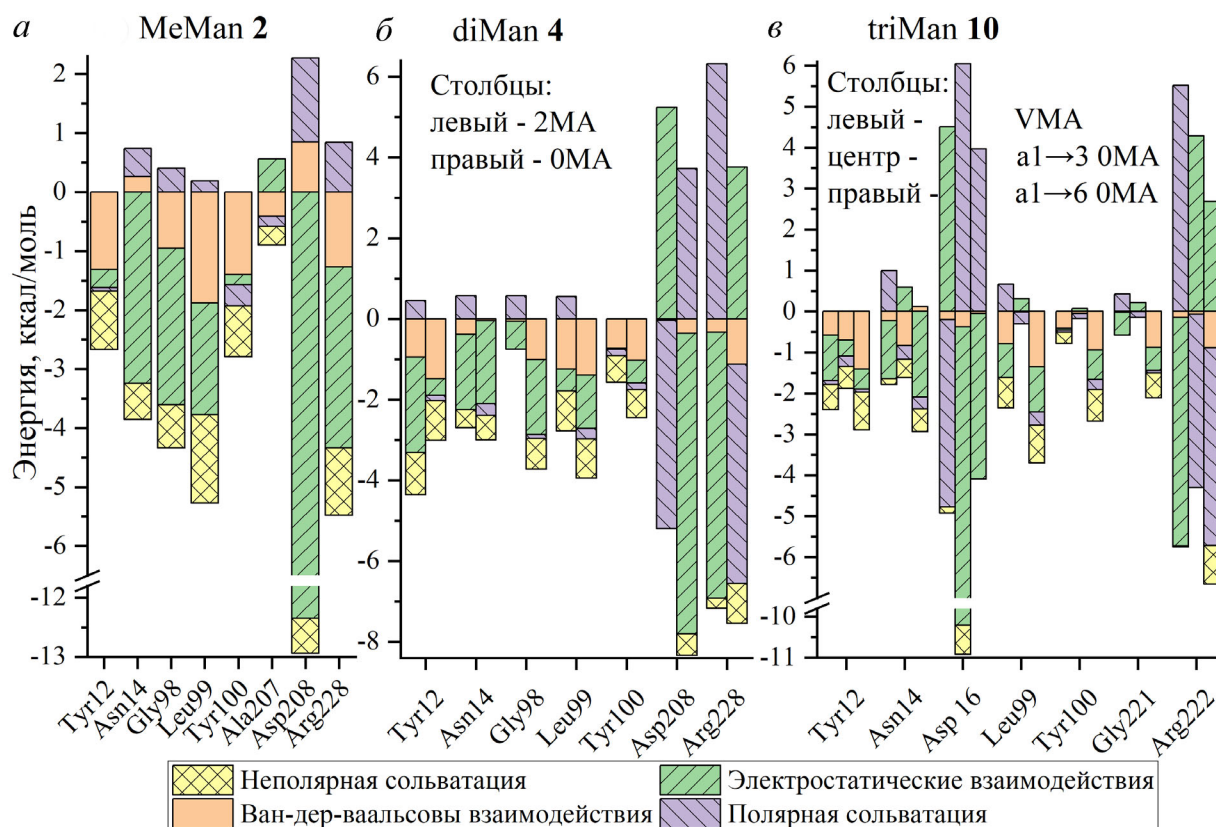


Рис. 6. Компоненты свободной энергии взаимодействия аминокислотных остатков ConA с лигандами MeMan 2 (*a*), diMan 4 (*б*) и MetriMan 10 (*в*). Значения приведены в ккал/моль. Для лигандов 4 и 10 показано разложение по составляющим Ман-остаткам: 0MA – концевой остаток, 2MA – Ман с $\alpha 2$ -позицией для связи, VMA – центральный Ман-остаток в триманнозиде

При связывании моносахаридов (рис. 6, *a*) с ConA наибольший вклад в свободную энергию вносят электростатические взаимодействия (70%) атомов Н, О пептидных связей и заряженных групп Asp, Asn, Arg с атомами лиганда. Дополнительная стабилизация связывания моносахарида достигается за счёт vdW-взаимодействий (18%) и неполярной сольватации (20%). Мешающим фактором является полярная сольватация – 8% затраты энергии.

При комплексообразовании действительно могут осуществляться стекинг-взаимодействия (СН- π) между Tyr и Ман-остатком с вкладом в свободную энергию 1–2 ккал/моль. Так, при переходе от Ман к diMan и triMan каждый новый углеводный остаток взаимодействует с Tyr, хотя и с меньшей термодинамической выгодой, однако общее значение энергетического вклада увеличивается от 2,3 до 4,4 ккал/моль.

Связывание диманнозы (рис. 6, *б*), как и в случае MeMan, обеспечивается электростатическими взаимодействиями заряженных групп Asp, Asn, Arg, но с меньшей долей (47%), так как проявляется сглаживание общей энергии за счёт

отталкивания второго остатка (2MA или 0MA). Большее значение приобретают гидрофобные взаимодействия с Tyr12, Tyr100 (включая СН- π стекинг с плоскостями Ман-остатков), Leu99.

Комплексообразование биантенного триманнозида (рис. 6, *в*) по компонентам энергии аналогично диманнозиду. Таким образом, связывание углеводных лигандов в значительной мере обусловлено электростатическими взаимодействиями [35], что согласуется с фактом потери углеводсвязывающей способности ConA при $pH < 4$. Однако велика роль гидрофобных остатков, в том числе ароматических, для увеличения аффинности за счёт СН- π -взаимодействий.

Вытеснение молекул воды. Кроме того, с помощью GIST [61–62] показано, что вблизи сайта связывания ConA и CRD4 энергии взаимодействия молекул воды с аминокислотными остатками рецептора неблагоприятны, $E_{sw} = -2$ ккал/(моль $\text{\AA}^3$), в то время как энергии растворитель–растворитель энергетически выгоднее, $E_{ww} = -18$ ккал/(моль $\text{\AA}^3$). При комплексообразовании триманнозида 9 с доменом CD206 происходит снижение ориентационной

энтропии воды с 4,4 до 0,7 ккал/(моль Å³) и увеличение позиционной компоненты с –139 до –102 ккал/(моль Å³) за счёт перераспределения молекул растворителя. Значит, вытеснение молекул воды лигандом при комплексообразовании обеспечивает дополнительную стабилизирующую термодинамическую составляющую [63–64].

Сравнение домена CD206 и ConA. Одна из задач работы состоит в определении границ применимости ConA в качестве модельного маннозного рецептора. Знание аспектов сходства и отличия рецепторов позволит апробировать системы доставки лекарств на доступном лектине и лишь после этого этапа на самих МР, что позволит значительно оптимизировать эксперименты *in vitro* и *in vivo* [3, 20]. Нами рассмотрены режимы комплексообразования, структуры сайтов связывания, механизмы задействования катионов металлов в связывании углеводов, значения энергий комплексообразования и константы диссоциации комплексов лиганд–рецептор, а также литературные примеры.

Наиболее веским подтверждением сходства закономерностей связывания углеводов ConA и CD206 является *близость относительных изменений констант диссоциаций комплексов* (таблица), что обуславливает обоснованность использования модельного лектина для оптимизации экспериментов *in vitro* и *in vivo* в пользу изучения большего количества лигандов и апробации потенциальных носителей лекарств. Так, коэффициент корреляции между свободными энергиями комплексообразования для шести описанных в литературе комплексов лигандов (№ 2, 4, 6–7, 10, 14) с CD206 и ConA составляет 0,90. В ходе моделирования получены достаточно релевантные значения энергий с высокой взаимосвязью между комплексами обоих рецепторов: данные МД по комплексообразованию CRD4 коррелируют с таковыми для нейросетевого анализа ConA с коэффициентом $r = 0,91$. Таким образом, ConA в закономерностях связывания моно- и олигосахаридов является хорошей моделью маннозного рецептора.

Режимы комплексообразования маннозосодержащих лигандов с рецептором. Главное отличие ConA от домена CD206 – тетрамерная структура. Считается, что все субъединицы ConA взаимодействуют с лигандами одинаково [65], что было поставлено под сомнение в ходе моделирования (табл. S2 в Приложении). Можно предположить, что это связано с возможностью взаимодействия лигандов с различными аминокислотными остатками, а не только определёнными (например, Gly98 и Leu99, расположенными в сайте связывания, вместо Arg228). Такая под-

вижность лигандов (особенно моносахаридов) заметна при моделировании в пс–нс временных интервалах, однако в экспериментах *in vitro* наблюдается усреднённая картина.

Для объяснения различий в субъединицах следует рассмотреть детали механизма комплексообразования. Заметно общее сходство в связывании Me-Man (рис. S4 в Приложении) в четырёх субъединицах, однако в А и В только по одной водородной связи, опосредованной водой, в субъединице С нет связи O3 с Arg228, но есть O2–Leu99. Кроме того, расстояния в субъединице D в основном больше, чем в других – сродство ниже.

Отличающиеся механизмы комплексообразования свидетельствуют о нескольких режимах связывания, реализующихся в субъединицах А–D ConA. Возможность вариативного связывания лигандов CRD4 CD206 не описана в литературе, но, вероятно, проявляется в аспектах задействования катиона кальция и конкретных а.о. с лигандом. Предполагается, что такая вариативность особенно заметна при участии как минимум нескольких углеводсвязывающих доменов (CRD4–8). В литературе описано подобное явление на примере маннозо-специфичного лектина ERGIC-53 [66], а также ConA [67]. Хотя все 4 субъединицы в ConA идентичны по составляющим аминокислотам, существуют небольшие отличия в их структурной организации (относительное расположение цепей) в результате формирования четвертичной структуры белка, что обуславливает обсуждаемые выше явления. Поэтому наиболее корректные параметры можно получить, усредняя значения энергий связывания для всех четырёх субъединиц, поскольку на практике реализуются все варианты связывания.

Сравнение структур домена CD206 и ConA (рис. S8 в Приложении). Ключевые сходства структурной организации ConA и CRD4 CD206 следующие: примерно одинаковое пространственное расположение аминокислот, близкий аминокислотный состав сайтов связывания углеводов (2 остатка Tyr, Asn, Asp, Ala, Leu, Pro), что обеспечивает реализацию связывания за счёт высокоэнергетических электростатических взаимодействий заряженных остатков аминокислот и дополнительной стабилизации гидрофобными и СН-π стекинг-взаимодействиями, обязательно присутствие Ca²⁺ (зелёный шар) для формирования сайта связывания.

Роль катионов Ca²⁺ и Mn²⁺ в связывающем центре рецепторов ConA и CD206 (рис. 7 в Приложении). Как обсуждалось выше, наличие катиона металла в сайте связывания необходимо для поддержания пространственной ориентации аминокислотных остатков рецептора.

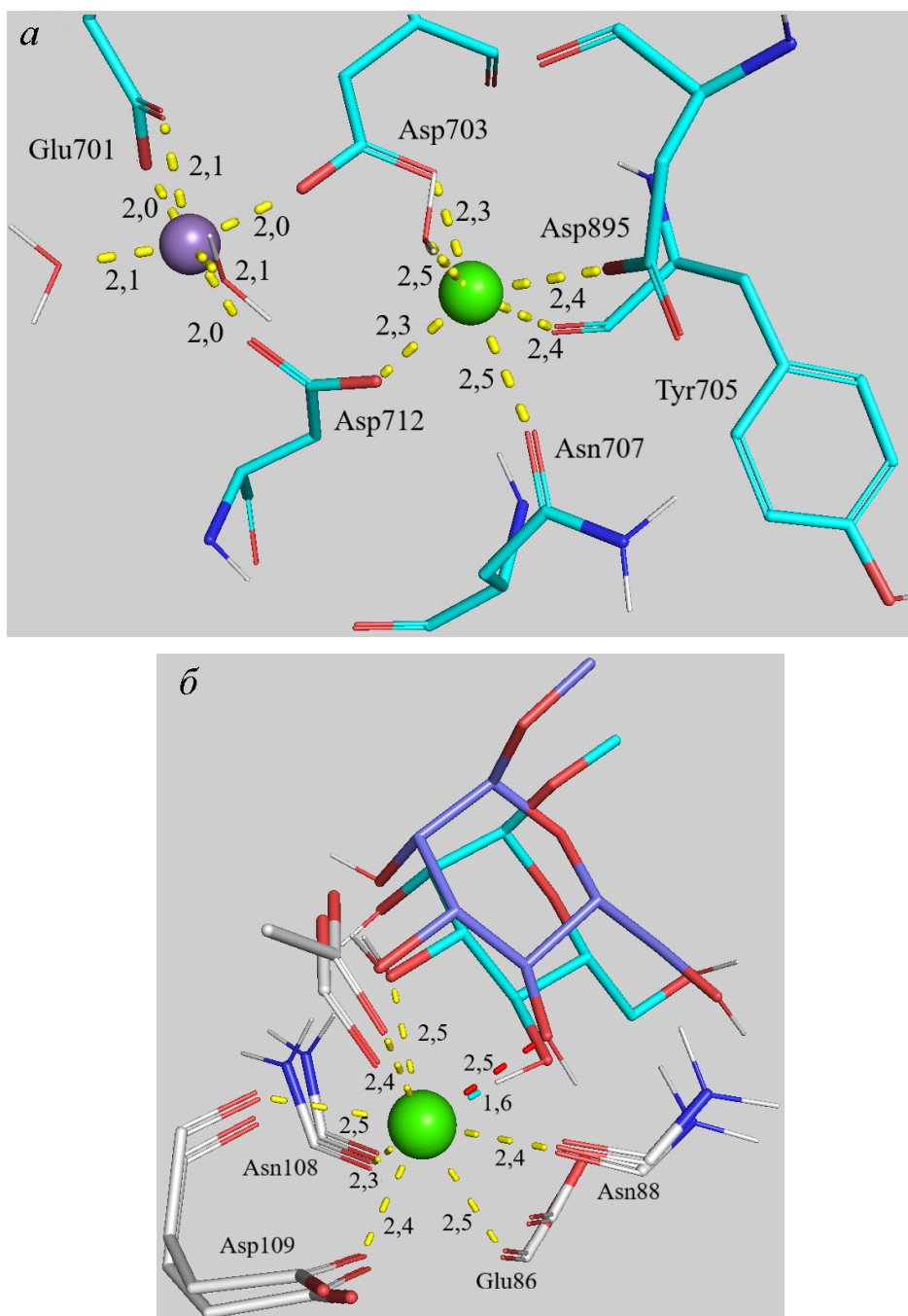


Рис. 7. *a* — Координационное окружение Mn^{2+} , Ca^{2+} в сайте ConA (субъединица C) при связывании триманнозида **9** (PDB Асс. No. 1ONA) по данным молекулярной динамики 10 нс. *б* — Координационное окружение Ca^{2+} в сайте домена CD206 при связывании метилманнозида **2** (PDB Асс. No. 7JUB). Сравнение исходных координат PDB (голубой) и структуры после молекулярной динамики 100 нс (фиолетовый)

В ConA роль опоры играет Ca^{2+} , который фиксирует остатки Asp703, Asp712 и Asp895, Asn707, Tyr705 и водой (рис. 7, *a*). Координационный полиэдр для катиона кальция — искажённый октаэдр (координационное число (КЧ) равно 6, ионный радиус 100 пм). Более того, дополнительная стабилизация положений аминокислот-

ных остатков и кальция достигается за счёт расположенного на расстоянии 4,2–4,4 Å от Ca^{2+} катиона Mn^{2+} , координирующего остатки Glu701, Asp703 и Asp712, а также две молекулы воды (рис. 7, *a*). Благодаря этому формируется сайт связывания высокоаффинный к консервативному ядру триманнозида [68–70].

Специфичность маннозного рецептора CD206 к Man-, Fuc- и GlcNAc-остаткам в гликанах обеспечивается механизмом, аналогичным рассмотренному выше для ConA. Ca^{2+} координирует Asn88, Asn108, Asp109 и Glu86, но в отличие от сайта в ConA с большими координационными числами, равным 8, и ионным радиусом 112 пм. Кроме того, катион Ca^{2+} в CRD4 играет важную роль в непосредственном связывании лиганда. На рис. 7, б показано взаимодействие метилманнозида **2** с Ca^{2+} . При моделировании связывания на основе исходных координат из PDB продемонстрировано изменение координационного окружения кальция атомами O2,3 MeMan до среднего расстояния 2,5 Å с образованием устойчивой квадратной антипризмы (рис. 7, б).

Литературные данные о сходстве CRD4 с ConA. Согласно литературным данным, CRD4 демонстрирует высокое сходство с маннан-связывающим лектином А, который, в свою очередь, похож на ConA в закономерностях связывания углеводов [71]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* при использовании маннозосодержащих лигандов, высокоспецифичных к ConA, для модификации средств доставки лекарственных препаратов к макрофагам путём нацеливания на МР наблюдаются положительные эффекты [20]: поглощение маннозилированных частиц клетками [72, 73], увеличение времени циркуляции лекарства в кровотоке и повышение концентрации в макрофагах [3], биораспределение маннозилированных липосом, преимущественно в лёгкие [74]. Все эти данные обуславливают релевантность применения ConA в качестве модели МР.

Настоящая ситуация и перспективы методов молекулярной динамики и нейросетевого анализа. Значения энергий комплексообразования и соответственно констант диссоциации комплексов рецептор–лиганд были рассчитаны для 15 лигандов с двумя рецепторами ConA и CRD4 CD206. Из них ранее в литературе не представлены 1 для конканавалина А и 9 – для маннозного рецептора. Достоверность полученных данных показана относительно экспериментальных данных из литературы. Коэффициенты корреляции свободных энергий для ConA и CRD4 CD206 по методу МД (анализ mmpbsa.py) соответственно равны 0,68 и 0,52, что можно считать хорошим результатом, учитывая количество изученных лигандов и новизну исследований МР.

Нужно отметить, что существующие алгоритмы далеко не совершенны, и компьютерное моделирование редко коррелирует с абсолютными значениями, полученными эксперимен-

тальными методами. Однако с развитием технологий эта проблема постепенно решается. Нейросети активно совершенствуются, что следует из результатов «соревнований CASF-2013» [75, 76]. Нами выбрана НС Pafnysu вследствие её лидирующей позиции среди алгоритмов по предсказанию аффинности лиганд–рецептор. Однако исходный алгоритм, обученный разработчиками на основе PDBbind2016, показал низкую точность применительно к рассматриваемым системам. Коэффициенты корреляции свободных энергий для ConA и CRD4 CD206 (нейросетевой анализ № 1) оказались не превосходящими 0,50, что, вероятно, связано с неподходящими весами в слоях НС для рассматриваемых систем. Поэтому авторы настоящей работы подготовили обучающий набор на основе PDBbind2020, увеличив количество циклов обучения до 25 и выбрав подходящие коэффициенты (раздел Методы, рис. S1 и табл. S1 в Приложении). Нейросеть с новыми параметрами показала более высокую точность предсказаний, превосходящую метод МД: коэффициенты корреляции энергий для ConA и CRD4 CD206 (нейросетевой анализ № 2) соответственно равны 0,82 и 0,8. Достигнутая точность в среднем совпадает с таковой для алгоритмов, описанных в литературе [77], хотя может быть увеличена.

Перспективы методов *in silico* широки. Усовершенствование алгоритмов НС и подготовка обучающих наборов с большим количеством релевантных данных о комплексах позволят увеличить точность предсказаний, что было показано выше. Применение молекулярной динамики с уточнёнными силовыми полями (amber) и увеличенным временем моделирования позволяет точнее определять термодинамические величины и структуры молекул, в том числе комплексов белок–лиганд, в условиях, приближённых к реальным (раствор, концентрация соли, температура).

Таким образом, с помощью молекулярной динамики и искусственных нейросетей определены параметры лектин-лигандных взаимодействий с учётом модели оптимизации. Компьютерные методы позволили получить пространственные структуры комплексов ConA и CRD4 CD206 с углеводными лигандами, большая часть которых ранее не описана. Кроме того, изучено комплексообразование маннозного рецептора, что крайне затруднительно *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нацеливание средств доставки терапевтических агентов на маннозные рецепторы макро-

фагов представляется перспективным методом повышения эффективности лечения целого ряда опасных заболеваний, включая аутоиммунные, онкологические и инфекционные. Поэтому требуется создание высокоселективных маннозилированных носителей лекарственных средств, оптимальная конфигурация которых может быть найдена с помощью компьютерного моделирования. В данной работе с помощью молекулярной динамики и искусственной нейросети Pafnсу проведено моделирование комплексообразования 15 углеводных лигандов, которые могут выступать в качестве адресной метки на молекуле для таргетирования макрофагов, с модельным тетрамером ConA и четвёртым доменом (вносящим наибольший вклад в углеводсвязывающую способность) маннозного рецептора CD206. Искусственные нейросети активно разрабатываются и развиваются, однако их применение в биологических системах пока не так широко. В данной работе продемонстрировано, что обученная на основе PDBbind2020 нейросеть, наряду с молекулярной динамикой, является эффективным инструментом для изучения механизмов взаимодействия лиганд–рецептор. В ходе компьютерного моделирования нами рассчитаны константы диссоциации комплексов лиганд–ConA, коррелирующие с литературными данными. С использованием отработанной модели впервые изучалось комплексообразование домена маннозного рецептора CD206 с лигандами, более того, нами рассчитаны 9 констант диссоциации комплексов, ранее не представленных в статьях. Показано, что ConA демонстрирует сходство с четвёртым доменом CD206 в закономерностях связывания углеводов, однако выявлены и отличия. Лектин ConA высокоспецифичен к ядру триманнозида

и его производным, а МР наиболее прочно связывает разветвлённые олигосахариды, состоящие из Ман-остатков, подобные поверхностным углеводам клеточной стенки микроорганизмов. Открывается возможность моделировать комплексообразование маннозного рецептора CD206 с олиго- и полимерными молекулами, модифицированными наиболее аффинными лигандами среди рассмотренных в данной работе, например, высокоманнозилированными циклодекстринами и хитозанами – перспективными носителями лекарств с функцией адресного нацеливания на маннозные рецепторы макрофагов.

Благодарности. Авторы выражают искренние благодарности Дроботу Виктору Валерьевичу (МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ им. Белозерского, химический факультет, НИВЦ) за консультации и советы по проведению молекулярной динамики; к.х.н. Виноградову Алексею Александровичу за концептуальные, методические и стилистические предложения по улучшению представленного материала; Злотникову Дмитрию Николаевичу за реализацию технической платформы для проведения молекулярных симуляций и нейросетевого анализа с использованием технологии докеризации.

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 опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>) том 87, вып. 1, 2022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Stepniewska-Dziubinska, M. M., Zielenkiewicz, P., and Siedlecki, P. (2018) Development and evaluation of a deep learning model for protein–ligand binding affinity prediction, *Bioinformatics*, **34**, 3666–3674, doi: 10.1093/bioinformatics/bty374.
- Banerjee, S., and Roy, S. (2019) Polysaccharide installed lipid nanoparticles in targeted antituberculosis drug delivery applications, in *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*, pp. 397–411, doi: 10.1016/b978-0-08-102553-6.00014-3.
- Filatova, L. Y., Klyachko, N. L., and Kudryashova, E. V. (2018) Targeted delivery of anti-tuberculosis drugs to macrophages: targeting mannose receptors, *Russ. Chem. Rev.*, **87**, 374–391, doi: 10.1070/rcr4740.
- Wong, M. E., Jaworowski, A., and Hearps, A. C. (2019) The HIV reservoir in monocytes and macrophages, *Front. Immunol.*, **10**, 1435–1450, doi: 10.3389/fimmu.2019.01435.
- Nikitina, E., Larionova, I., Choinzonov, E., and Kzhyshkowska, J. (2018) Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2821–2845, doi: 10.3390/ijms19092821.
- Tormoen, G. W., Crittenden, M. R., and Gough, M. J. (2018) Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy, *Adv. Rad. Oncol.*, **3**, 520–526, doi: 10.1016/j.adro.2018.08.018.
- Shan, H., Dou, W., Zhang, Y., and Qi, M. (2020) Targeted ferritin nanoparticle encapsulating CpG oligodeoxynucleotides induces tumor-associated macrophage M2 phenotype polarization into M1 phenotype and inhibits tumor growth, *Nanoscale*, **12**, 22268–22280, doi: 10.1039/d0nr04520a.
- Le Menn, G., and Neels, J. (2018) Regulation of immune cell function by PPARs and the connection with metabolic and neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1575, doi: 10.3390/ijms19061575.

9. Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., and Syed, M. A. (2018) Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases, *Immunobiology*, **223**, 383-396, doi: 10.1016/j.imbio.2017.11.001.
10. Lyadova, I. V., and Pantelev, A. V. (2015) Th1 and Th17 cells in tuberculosis: Protection, pathology, and biomarkers, *Med. Inflamm.*, **2015**, 854507, doi: 10.1155/2015/854507.
11. Zhang, H.-L., Zheng, X.-Y., and Zhu, J. (2013) Th1/Th2/Th17/Treg cytokines in Guillain-Barré syndrome and experimental autoimmune neuritis, *Cyt. Grow. Fact. Rev.*, **24**, 443-453, doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.05.005.
12. Stahl, P. D. (1990) The macrophage mannose receptor: Current status, *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **2**, 317-318, doi: 10.1165/ajrcmb/2.4.317.
13. Feinberg, H., Jegouzo, S. A. F., Lasanajak, Y., Smith, D. F., Drickamer, K., et al. (2021) Structural analysis of carbohydrate binding by the macrophage mannose receptor CD206, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100368-100385, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100368.
14. Feinberg, H., Park-Snyder, S., Kolatkar, A. R., Heise, C. T., Taylor, M. E., et al. (2000) Structure of a C-type carbohydrate recognition domain from the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **275**, 21539-21548, doi: 10.1074/jbc.m002366200.
15. Taylor, M. E., and Drickamer, K. (1993) Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **268**, 399-404, doi: 10.1016/S0021-9258(18)54164-8.
16. Naismith, J. H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., et al. (1994) Refined structure of concanavalin A complexed with methyl α -D-mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure, *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.*, **50**, 847-858, doi: 10.1107/s0907444994005287.
17. Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J. R., Kalb, A. J., Dodson, E. J., et al. (1989) The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A, *EMBO J.*, **8**, 2189-2193, doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08341.x.
18. Brewer, C. F., Brown, R. D., and Koenig, S. H. (1983) Metal ion binding and conformational transitions in concanavalin-A: A structure-function study, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1**, 961-997, doi: 10.1080/07391102.1983.10507497.
19. Kaushik, S., Mohanty, D., and Surolia, A. (2009) The role of metal ions in substrate recognition and stability of concanavalin A: A molecular dynamics study, *Biophys. J.*, **96**, 21-34, doi: 10.1529/biophysj.108.134601.
20. Zlotnikov, I. D., and Kudryashova, E. V. (2022) Mannose receptors of alveolar macrophages as a target for delivery of medicines to the lungs, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **48**, doi: 10.1134/S1068162022010150.
21. Mandal, D. K., Kishore, N., and Brewer, C. F. (1994) Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and ovalbumin to concanavalin A, *Biochemistry*, **33**, 1149-1156, doi: 10.1021/bi00171a014.
22. Dam, T. K., Roy, R., Das, S. K., Oscarson, S., and Brewer, C. F. (2000) Binding of multivalent carbohydrates to concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin, *J. Biol. Chem.*, **275**, 14223-14230, doi: 10.1074/jbc.275.19.14223.
23. Landschoot, A., Loontjens, F. G., and Bruyne, C. K. (1980) Binding of manno-oligosaccharides to concanavalin A. Substitution titration with a fluorescent-indicator ligand, *Eur. J. Biochem.*, **103**, 307-312, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04316.x.
24. Злотников И. Д., Ваничкин Д. А., Кудряшова Е. В. (2021) Методы определения параметров рецептор-лигандных взаимодействий на модели конканавалина А и маннозилированных хитозанов – перспективных носителей для доставки лекарственных средств к альвеолярным макрофагам, *Биотехнология*, **37**, 28-40, doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-28-40.
25. Le-Deygen, I. M., Mamaeva, P. V., Skuredina, A. A., and Kudryashova, E. V. (2020) A spectral approach to study interaction between chitosan modified with mannose and concanavalin A for the creation of address delivery systems of antituberculosis drugs, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **75**, 213-217, doi: 10.3103/S0027131420040045.
26. Goldstein, I. J., and Poretz, R. D., (1986) *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press.
27. Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages, *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 23-35, doi: 10.1038/nri978.
28. Sharma, A., Porterfield, J. E., Smith, E., Sharma, R., Kannan, S., et al. (2018) Effect of mannose targeting of hydroxyl PAMAM dendrimers on cellular and organ biodistribution in a neonatal brain injury model, *J. Control. Rel.*, **283**, 175-189, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.06.003.
29. Tran, D. P., and Kitao, A. (2019) Dissociation process of MDM2/p53 complex investigated by parallel cascade selection molecular dynamics and Markov state model, *J. Phys. Chem. B.*, **123**, 2469-2478, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b10309.
30. Hollingsworth, S. A., Nguyen, B. D., Chreifi, G., Arce, A. P., and Poulos, T. L. (2017) Insights into the dynamics and dissociation mechanism of a protein redox complex using molecular dynamics, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 2344-2350, doi: 10.1021/acs.jcim.7b00421.
31. Tran, D. P., Takemura, K., Kuwata, K., and Kitao, A. (2017) Protein-Ligand dissociation simulated by parallel cascade selection molecular dynamics, *J. Chem. Theory Comput.*, **14**, 404-417, doi: 10.1021/acs.jctc.7b00504.
32. Mollica, L., Decherchi, S., Zia, S. R., Gaspari, R., Cavalli, A., et al. (2015) Kinetics of protein-ligand unbinding via smoothed potential molecular dynamics simulations, *Sci. Rep.*, **5**, doi: 10.1038/srep11539.
33. Fu, Y., Zhao, J., and Chen, Z. (2018) Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: a case of oligopeptide binding protein, *Comput. Math. Meth. Med.*, **2018**, 1-12, doi: 10.1155/2018/3502514.
34. Bradbrook, G. M., Gleichmann, T., Harrop, S. J., Habash, J., Raftery, J., et al. (1998) X-Ray and molecular dynamics studies of concanavalin-A glucoside and mannose complexes relating structure to thermodynamics of binding, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 1603-1611, doi: 10.1039/a800429c.
35. Bryce, R. A., Hillier, I. H., and Naismith, J. H. (2001) Carbohydrate-protein recognition: Molecular dynamics simulations and free energy analysis of oligosaccharide binding to concanavalin A, *Biophys. J.*, **81**, 1373-1388, doi: 10.1016/s0006-3495(01)75793-1.
36. Arcon, J. P., Defelipe, L. A., Modenutti, C. P., Lopez, E. D., Alvarez-Garcia, D., et al. (2017) Molecular dynamics in mixed solvents reveals protein-ligand interactions, improves docking, and allows accurate binding free energy predictions, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 846-863, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00678.
37. Zacharias, M. (2004) Rapid protein-ligand docking using soft modes from molecular dynamics simulations to account for protein deformability: binding of FK506 to FKBP, *Prot. Str. Fun. Bioinf.*, **54**, 759-767, doi: 10.1002/prot.10637.
38. Mollica, L., Theret, I., Antoine, M., Perron-Sierra, F., Charton, Y., et al. (2016) Molecular dynamics simulations and kinetic measurements to estimate and predict protein-ligand residence times, *J. Med. Chem.*, **59**, 7167-7176, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00632.

39. Wang, S., Liu, D., Ding, M., Du, Z., Zhong, Y., et al. (2021) SE-OnionNet: a convolution neural network for protein–ligand binding affinity prediction, *Front. Gen.*, **11**, 607824, doi: 10.3389/fgene.2020.607824.
40. Durrant, J. D., and McCammon, J. A. (2011) NNScore 2.0: A neural-network receptor–ligand scoring function, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 2897–2903, doi: 10.1021/ci2003889.
41. Lahey, S.-L. J., and Rowley, C. N. (2020) Simulating protein–ligand binding with neural network potentials, *Chem. Sci.*, **11**, 2362–2368, doi: 10.1039/c9sc06017k.
42. Zhou, Y., Wang, F., Tang, J., Nussinov, R., and Cheng, F. (2020) Artificial intelligence in COVID-19 drug repurposing, *Lanc. Dig. Heal.*, **2**, 667–676, doi: 10.1016/s2589-7500(20)30192-8.
43. Pham, T.-H., Qiu, Y., Zeng, J., Xie, L., and Zhang, P. (2021) A deep learning framework for high-throughput mechanism-driven phenotype compound screening and its application to COVID-19 drug repurposing, *Nat. Mach. Intel.*, **3**, 247–257, doi: 10.1038/s42256-020-00285-9.
44. Книга А. Е., Поляков И. В., Немухин А. В. (2021) *In silico* определение специфичности неоантиген-реактивных Т-лимфоцитов, *Биомедицинская химия*, **67**, 251–258, doi: 10.18097/pbmc20216703251.
45. Manasaryan, G., Suplatov, D., Pushkarev, S., Drobot, V., Kuimov, A., et al. (2021) Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in Poly(ADP-ribose) polymerase family proteins, *Cancers*, **13**, 1201, doi: 10.3390/cancers13061201.
46. Timonina, D., Sharapova, Y., Švedas, V., and Suplatov, D. (2021) Bioinformatic analysis of subfamily-specific regions in 3D-structures of homologs to study functional diversity and conformational plasticity in protein superfamilies, *Comput. Struct. Biotech. J.*, **19**, 1302–1311, doi: 10.1016/j.csbj.2021.02.005.
47. Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., et al. (2021) *Amber 2021: Reference Manual*, University of California, San Francisco.
48. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, **79**, 926–935, doi: 10.1063/1.445869.
49. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *J. Comput. Phys.*, **23**, 327–334, doi: 10.1016/0021-9991(77)90098-5.
50. Miller, B. R., McGee, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., et al. (2012) MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations, *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 3314–3321, doi: 10.1021/ct300418h.
51. Roe, D. R., and Cheatham, T. E. (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J. Chem. Theory Comput.*, **9**, 3084–3095, doi: 10.1021/ct400341p.
52. Hitchen, P. G., Mullin, N. P., and Taylor, M. E. (1998) Orientation of sugars bound to the principal C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor, *Biochem. J.*, **333**, 601–608, doi: 10.1042/bj3330601.
53. Mullin, N. P., Hitchen, P. G., and Taylor, M. E. (1997) Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **272**, 5668–5681, doi: 10.1074/jbc.272.9.5668.
54. Ascitutto, E. K., Kopanchuk, S., Lepland, A., Simón-Gracia, L., Aleman, C., et al. (2019) A phage display-derived peptide binds to human CD206 and modeling reveals a new binding site in the receptor, *J. Phys. Chem. B.*, **123**, 1973–1982, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b11876.
55. Taylor, M. E., Bezouska, K., and Drickamer, K. (1992) Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1719–1726, doi: 10.1016/S0021-9258(18)46005-X.
56. Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., et al. (2002) The protein data bank, *Acta Cryst. Sect. D Biol. Cryst.*, **58**, 899–907, doi: 10.1107/s0907444902003451.
57. Böhm, H. J., and Schneider, G. (2003) Protein–Ligand Interactions, in *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, pp. 3–20, doi: 10.1002/3527601813.
58. Huang, K., Luo, S., Cong, Y., Zhong, S., Zhang, J. Z. H., et al. (2020) Accurate free energy estimator: Based on MM/PBSA combined with interaction entropy for protein–ligand binding affinity, *Nanoscale*, **12**, 10737–10750, doi: 10.1039/c9nr10638c.
59. Spiwok, V. (2017) CH/π interactions in carbohydrate recognition, *Molecules*, **22**, 1038, doi: 10.3390/molecules22071038.
60. Spiwok, V., Lipovova, P., Skalova, T., Buchtelova, E., Hasek, J., et al. (2004) Role of CH/π interactions in substrate binding by *Escherichia coli* β-galactosidase, *Carb. Res.*, **339**, 2275–2280, doi: 10.1016/j.carres.2004.06.016.
61. Lazaridis, T. (1998) Inhomogeneous fluid approach to solvation thermodynamics. 1. Theory, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3531–3541, doi: 10.1021/jp9723574.
62. Nguyen, C. N., Young, T. K., and Gilson, M. K. (2012) Grid inhomogeneous solvation theory: hydration structure and thermodynamics of the miniature receptor cucurbit[7]uril, *J. Chem. Phys.*, **137**, 044101, doi: 10.1063/1.4733951.
63. Hufner-Wulsdorf, T., and Klebe, G. (2020) Protein–ligand complex solvation thermodynamics: Development, parameterization, and testing of GIST-based solvent functionals, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**, 1409–1423, doi: 10.1021/acs.jcim.9b01109.
64. Ramsey, S., Nguyen, C., Salomon-Ferrer, R., Walker, R. C., Gilson, M. K., et al. (2016) Solvation thermodynamic mapping of molecular surfaces in AmberTools: GIST, *J. Comp. Chem.*, **37**, 2029–2037, doi: 10.1002/jcc.24417.
65. Dimick, S. M., Powell, S. C., McMahon, S. A., Moothoo, D. N., Naismith, J. H., et al. (1999) On the meaning of affinity: Cluster glycoside effects and concanavalin A, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10286–10296, doi: 10.1021/ja991729e.
66. Satoh, T., Suzuki, K., Yamaguchi, T., and Kato, K. (2014) Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36, *PLoS One*, **9**, 87963, doi: 10.1371/journal.pone.0087963.
67. Moothoo, D. N., Canan, B., Field, R. A., and Naismith, J. H. (1999) Man α1-2 Man α-OMe-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition, *Glycobiology*, **9**, 539–545, doi: 10.1093/glycob/9.6.539.
68. Naismith, J. H., and Field, R. A. (1996) Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A, *J. Biol. Chem.*, **271**, 972–976, doi: 10.1074/jbc.271.2.972.
69. Gupta, D., Dam, T. K., Oscarson, S., and Brewer, C. F. (1997) Thermodynamics of lectin–carbohydrate interactions, *J. Biol. Chem.*, **272**, 6388–6392, doi: 10.1074/jbc.272.10.6388.
70. Mandal, D. K., Bhattacharyya, L., Koenig, S. H., Brown, R. D., Oscarson, S., et al. (1994) Studies of the binding specificity of concanavalin A. Nature of the extended binding site for asparagine-linked carbohydrates, *Biochemistry*, **33**, 1157–1162, doi: 10.1021/bi00171a015.
71. Weis, W. I., and Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin–carbohydrate recognition, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 441–473, doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002301.

72. Ghotbi, Z., Haddadi, A., Hamdy, S., Hung, R. W., Samuel, J., et al. (2010) Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles, *J. Drug Target*, **19**, 281-292, doi: 10.3109/1061186X.2010.499463.
73. Chen, P., Zhang, X., Jia, L., Prud'homme, R. K., Szekely, Z., et al. (2014) Optimal structural design of mannosylated nanocarriers for macrophage targeting, *J. Control. Rel.*, **194**, 341-349, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.09.006.
74. Nimje, N., Agarwal, A., Saraogi, G. K., Lariya, N., Rai, G., et al. (2009) Mannosylated nanoparticulate carriers of rifabutin for alveolar targeting, *J. Drug Target*, **17**, 777-787, doi: 10.3109/10611860903115308.
75. Li, Y., Liu, Z., Li, J., and Wang, R. (2014) Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 1. Compilation of the test set, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**, 1700-1716, doi: 10.1021/ci500080q.
76. Li, Y., Han, L., Liu, Z., and Wang, R. (2014) Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 2. Evaluation methods and general results, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**, 1717-1736, doi: 10.1021/ci500081m.
77. Nguyen, D. D., Xiao, T., Wang, M., and Wei, G.-W. (2017) Rigidity strengthening: A mechanism for protein-ligand binding, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 1715-1721, doi: 10.1021/acs.jcim.7b00226.

COMPUTER SIMULATION OF RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS MANNOSE RECEPTOR CD206 IN COMPARISON WITH THE MODEL LECTIN CONCAVALIN A

I. D. Zlotnikov and E. V. Kudryashova*

*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru*

With using the methods of molecular dynamics and neural network analysis, computer modeling of the complexation of mono- and oligosaccharide ligands with the main (fourth) carbohydrate-binding domain of the mannose receptor CD206 (CRD4), as well as with the model receptor concanavalin A (ConA), was carried out for the first time. It is shown that Con is a relevant CD206 (CRD4) model due to the similarity of the structural organization of the binding sites and the high correlation of the values of the free energies of complexation $r > 0.9$ according to literature data and computer modeling. The role of the main factors affecting the affinity of ligand-receptor interactions is discussed: the number and nature of carbohydrate residues, the presence of the Me-group in the O1 position, the type of glycoside bond in the dimannose. It is shown that the complexation of ConA and CD206 with ligands is energetically caused by the electrostatic interactions of charged residues (Asn, Asp, Arg) with oxygen and hydrogen atoms in carbohydrates; the hydrophobic and van der Waals components contribute less. A possible variant of additional stabilization of complexes due to CH- π stacking interactions of Tyr with the Man plane is discussed. The role of calcium and manganese ions in ligand binding processes has been studied. The free energies of complexation calculated in the course of molecular dynamics correlate with experimental data (published for the model ConA): correlation coefficient $r = 0.68$. The Pafnucy neural network was trained based on a set of PDBbind2020 ligand-receptor complexes, which significantly increased the accuracy of energy predictions to $r = 0.8$ and 0.82 , respectively, for CD206 and ConA receptors. A model of normalization of the complexation energy values for calculating the relevant values of ΔG_{bind} , K_d is proposed. Based on the developed technique, the values of the dissociation constants of a series of CD206 complexes with 9 carbohydrate ligands of different structures not previously characterized were determined. The obtained data open up prospects for using of computer modeling for the development of optimal drug carriers with the function of active targeting of macrophages, and also determine the limits of the applicability of using ConA as a relevant model for studying the parameters of CD206 binding to various carbohydrate ligands.

Keywords: molecular dynamics, artificial neural network, CD206, concanavalin A, macrophages

ЛАБИЛЬНОСТЬ ЗАЩИТНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ Nrf2/Keap/ARE В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ И ВОЗРАСТНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Обзор

© 2022 Г.А. Шиловский^{1,2,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.11.2021

После доработки 10.12.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Известно, что с возрастом в организме растёт уровень окислительного стресса. Накопление повреждений, приводящее к нарушению целостности генома, может быть причиной развития многих возрастных заболеваний и появления фенотипических и физиологических признаков старения. В связи с этим большой интерес вызывает система Nrf2, регулирующая экспрессию многочисленных ферментов, ответственных за антиоксидантную защиту и детоксикацию. В обзоре обобщены и проанализированы данные, касающиеся изменений системы Nrf2 при старении *in vivo* и *in vitro* в различных органах и тканях. Анализ литературы позволяет сделать вывод, что способность Nrf2 к активации (запускаемая повышенным уровнем окислительного стресса) неуклонно снижается с возрастом. В то же время динамика активности Nrf2, измеряемая в бесстрессовых условиях, такой чёткой направленности не имеет: во многих работах приведённые различия статистически недостоверны, хотя точно известно, что при старении уровень окислительного стресса неуклонно повышается. В обзоре рассматривается роль существующих в клетке систем регуляции, ограничивающих способность Nrf2 реагировать на окислительный стресс. Стареющие клетки уязвимы к окислительному повреждению из-за нарушения передачи сигналов Nrf2, и активация пути Nrf2 является перспективной мишенью для новых фармакологических или генетических терапевтических стратегий. Супрессоры экспрессии Nrf2, такие как Keap1, с-Мус, Gsk3 и Bach1, могут способствовать возрастному нарушению индуцибельности Nrf2-регулируемых антиоксидантных генов. Понимание механизмов взаимодействия регуляторных каскадов, связывающих программы поддержания гомеостаза и ответа клетки на окислительный стресс, способствует выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе старения и долголетия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Nrf2, Keap1, старение, продолжительность жизни, окислительный стресс, возрастные нарушения, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0320972522010067

ВВЕДЕНИЕ

Продолжительность жизни (ПЖ) является такой же устойчивой видовой характеристикой, как размеры тела или плодовитость. Её длительность, а также механизмы, её обеспечивающие, должны быть хотя бы частично запрограммиро-

ваны в геноме [1–3], несмотря на то что, с эволюционной точки зрения, первоочередной эволюционной «задачей» для живых организмов является не долголетие как таковое, а проблемы адаптации к окружающей среде, связанные с нуждами выживания, обеспечения пищей и размножения. К внутренним факторам, опреде-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПЖ – продолжительность жизни; УКП – удвоение клеточной популяции; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); Bach1 – белок BTB domain and CNC homolog 1; Gcl – глутаматцистеинлигаза; Gclc – каталитическая субъединица глутаматцистеинлигазы (glutamate-cysteine ligase catalytic); Gclm – регуляторная субъединица глутаматцистеинлигазы (glutamate-cysteine modifier); GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Ho-1 – гемоксигеназа 1; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); NIHL – потеря слуха, вызванная шумом (noise-induced hearing loss); Nqo1 – NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1; Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (nuclear factor erythroid 2-related factor 2); NSPC – предшественники стволовых нервных клеток (neural stem progenitor cells); RPE – пигментный эпителий сетчатки; VSMC – гладкомышечные клетки сосудов (vascular smooth muscle cells).

ляющим ПЖ и форму кривых выживания (*pace and shape of aging*), относятся программы старения и антистарения, представляющие собой, по современным представлениям, совокупность сигнальных генных каскадов [4]. Регуляция поддержания гомеостаза и репарации представляет собой сложную сеть взаимосвязанных реакций, а эффективность этих процессов ухудшается с возрастом [1–6]. Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) является ключевым фактором транскрипции, участвующим в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток и передаче сигналов, и играет центральную роль в снижении внутриклеточного окислительного стресса, замедлении старения клеток и предотвращении возрастных заболеваний [4–9].

Nrf2, кроме всего прочего, является основным регулятором клеточного гомеостаза, который контролирует поддержание стабильности генома. Он регулирует экспрессию более 1% генов человека, связанных с реакциями биотрансформации, редокс-гомеостазом, энергетическим метаболизмом, репарацией ДНК и протеостазом, а также регуляцией транскрипции антиоксидантных и детоксицирующих ферментов, которые в совокупности представляют собой мощную защитную систему клетки [4, 5]. Общей характеристикой таких генов является наличие последовательности(-ей) ARE (antioxidant response element) в промоторном участке. Активность Nrf2 оказывает огромное влияние на самые разные физиологические и патологические процессы, поэтому он подвергается строгой регуляции в основном на уровне стабильности белка. Nrf2 активируется окислительными стрессорами и электрофильными агентами. Продукты его генов-мишеней регулируют множество защитных функций, в том числе – детоксикацию лекарств, пентозофосфатный шунт и аутофагию [7]. Nrf2 регулирует синтез глутатиона, а также ферментов, участвующих в его гомеостазе, а именно: каталитическую (Gclc) и регуляторную глутаматцистеинмодифицирующую (Gclm) субъединицы глутаматцистеинлигазы (Gcl), которые, объединяясь, образуют гетеродимер Gcl. Nrf2 также опосредует индукцию некоторых других классов антиоксидантных белков (например, тиоредоксина, пероксиредоксина, сульфиредоксина, ферритина, металлотионеина и гемоксигеназы 1 (Ho-1)) и опосредует индукцию ферментов, метаболизирующих лекарственные средства фазы I и фазы II (например, альдо-кеторедуктазы, глутатион-S-трансферазы и NAD(P)H:хинооксидоредуктазы 1 (Nqo1)) [10]. Также Nrf2 непосредственно ингибирует индуцированную экспрес-

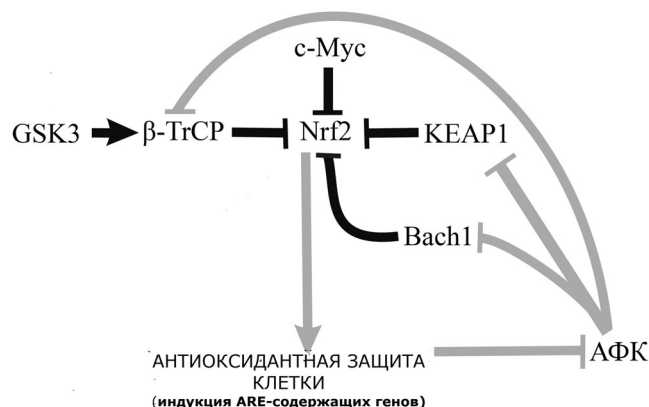


Рис. 1. Схема регуляции транскрипционного фактора Nrf2, управляющего экспрессией более чем 200 цитопротекторных ферментов, ответственных за детоксикацию и антиоксидантную защиту. Активация Nrf2 вызывается действием активных форм кислорода (АФК). В то же время активируемая многими сигнальными путями киназа гликогенсинтазы 3 (GSK3) оказывает подавляющее действие, ингибируя транскрипционный фактор Nrf2. Светлыми линиями обозначены эффекты, стимулирующие активность Nrf2 (и последующую экспрессию антиоксидантных ферментов); темными линиями – ингибиторов Nrf2. Стрелкой обозначено прямое стимулирующее воздействие, включая катализ; линией с тупым концом обозначено ингибирующее действие. АФК – активные формы кислорода; Bach1 – белок BTV domain and CNC homolog 1; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); Nrf2 – NFE2-related factor 2 (транскрипционный фактор 2 семейства NFE); β-TrCP – белок, содержащий β-трансдуциновые повторы (β-transducin repeat containing protein)

сию различных генов, связанных с воспалением, посредством связывания с их проксимальными регуляторными областями [11]. Всё это позволяет считать его компонентом особой антивозрастной программы – хранителем периода здоровой жизни и долголетия [5]. Согласно Skulachev et al. [4], транскрипционный фактор Nrf2 является представителем одной из наиболее явных клеточных программ антистарения (рис. 1).

В предыдущем обзоре [9] мы уделили внимание защитной системе Nrf2/Keap1/ARE и её регуляции со стороны системы циркадных биоритмов. Целью данной работы является анализ данных о возрастных изменениях защитной системы Nrf2/Keap1/ARE в контексте программ старения и антистарения.

С возрастом происходит ухудшение работы антиоксидантных систем клетки, в том числе и пути Nrf2/ARE, что приводит к снижению уровня экспрессии генов-мишеней Nrf2 [5, 8, 12–17]. Это приводит к повышению уровня активных форм кислорода (АФК) в тканях, истощению глутатиона и повышенному окислитель-

ному повреждению белков, ДНК и липидов [12, 13]. Наряду с этим растёт уровень экспрессии генов-мишеней NF-κB, таких как молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и интерлейкин-6 (IL-6) [14, 18].

Активация пути Nrf2 состоит из нескольких стадий, включая экспрессию и синтез белка Nrf2, его транспорт в ядро, связывание с элементом ARE соответствующего гена-мишени (в том числе и самого Nrf2), а затем экспрессии гена-мишени и синтеза соответствующего белка. Предлагаемый в настоящей работе количественный анализ возрастной динамики активности различных компонентов пути Nrf2 в различных органах и тканях позволит выявить наиболее чувствительные к возрастным изменениям стадии этого процесса и позволит предположить, какие ткани и при каких условиях эксперимента наиболее устойчивы к окислительному стрессу за счёт индукции экспрессии генов-мишеней Nrf2, а также оценить степень компенсации возрастных нарушений работы этого пути за счёт различных препаратов-активаторов Nrf2.

Большое число работ посвящено сравнению уровня экспрессии мРНК и белка Nrf2 и способности его к активации в ответ на окислительный (электрофильный) стресс в препаратах, полученных из различных тканей линейных крыс (Fischer и Sprague-Dawley) и мышей (C57BL/6J) разного возраста [5, 8, 12–15, 17]. Этот показатель, по существу, определяет уровень активных антиоксидантных ферментов, борющихся с окислительным стрессом, усиливающимся в клетках при старении *in vitro* и *in vivo*. Обычно в качестве свидетельства активации Nrf2 судят по активности трёх антиоксидантных ферментов: Nqo1, Ho-1 и двух субъединиц Gcl (Gclc и Gclm). Ещё одной характеристикой функциональной активации Nrf2 является увеличение количества белка Nrf2, перемещённого в ядро.

Ниже мы приводим обзор работ, посвящённый возраст-зависимой экспрессии белка и мРНК Nrf2 и его генов-мишеней в различных органах и тканях. Обсуждаемые здесь исследования на грызунах охватывают различные возрастные периоды жизни, которые обычно составляют 28–32 мес. Важно, что животные, называемые «старыми», могут сильно различаться по возрасту в разных работах. Для мышей возрастные изменения можно представить как период созревания (2–5 мес.) и период «среднего возраста» (12–24 мес.), которые характеризуются низким уровнем смертности и заболеваемости раком, гломерулонефритом и другими дегенеративными заболеваниями. В возрасте

24–26 мес. хронические дегенеративные заболевания и смертность резко возрастают [16]. Поэтому более старых мышей исследуют редко, чтобы свести к минимуму возможное влияние на общее состояние организма развившейся острой/хронической патологии того или иного органа. Считается, что при здоровом старении (healthy aging) по физиологическому возрасту 6-месячная мышь эквивалентна 30-летнему человеку, в то время как 21-месячная мышь эквивалентна 60-летнему человеку [16]. Также отметим, что практически все приведённые в литературе данные по изменению активности и экспрессии Nrf2 являются результатами не лонгитудинальных, а поперечных (cross-sectional) исследований, поэтому, хотя мы, следуя сложившейся в литературе традиции, и будем пользоваться термином «изменение активности и экспрессии Nrf2 с возрастом», надо подчеркнуть, что речь идёт о сравнении этого показателя у животных разного возраста.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА И мРНК Nrf2 И ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

Печень. Shih и Yen [19] изучали уровень экспрессии Nrf2 (с помощью Вестерн-блоттинга), уровень окислительного стресса, а также активность и уровень экспрессии Nrf2 в экстрактах печени 2-, 12- и 18–24-мес. крыс линии Sprague-Dawley. Эти исследования особенно интересны, так как печень характеризуется наиболее высоким уровнем антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, экспрессия которых находится под контролем Nrf2. С возрастом увеличивается уровень окислительного стресса: карбонилирование белка становится в 1,5 раза выше у 12-мес. крыс и в 3 раза — у 18–24-мес. крыс, тогда как показатель перекисного окисления липидов (уровень TBARS [thiobarbituric acid reactive substances]) выше в 1,5 раза в возрасте 18–24 мес. по сравнению с 2-мес. крысами. При этом активность Nqo1 монотонно снижается с возрастом и составляет ~5000 нмоль/мин/мг белка у 2-мес. крыс, ~3000 — у 12-мес. крыс и ~1000 — у 18–24-мес. крыс ($p < 0,05$). Активность каталазы не различается у 2- и 12-мес. крыс (~20 нмоль/мин/мг белка), а у 18–24-мес. составляет ~15 нмоль/мин/мг белка; ($p < 0,05$). При этом у 2- и 12-мес. крыс уровень экспрессии антиоксидантных ферментов не отличается достоверно, но у 18–24-мес. крыс он составляет 53%, 60%, 62%, 69% и 72% (для глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, Nqo1 и каталазы соответственно) по сравнению с 2-мес. крысами

($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии Nrf2 в печени также *не различается* у 2- и 12-мес. крыс; а для крыс 18–24 мес. — более чем в 2 раза *ниже* по сравнению с 2-мес. животными ($p < 0,05$).

Сходные результаты получены в работе Suh et al. [12], показавшими (Вестерн-блоттинг) снижение общего уровня Nrf2 (на 56,2%, $p < 0,001$) с одновременным сопоставимым снижением ядерного (т.е. транскрипционно активного) (на 51,7%, $p < 0,0001$) уровня Nrf2 у старых крыс Fischer 344 (24–28 мес.) по сравнению с молодыми (2–5 мес.). Связывание Nrf2 с консенсусной последовательностью ARE в ядерных экстрактах печени старых крыс также было *ниже* (примерно на 40%), чем у молодых животных (анализ геле-шифт). Снижение транскрипционной активности Nrf2 вызывает снижение синтеза глутатиона [12].

В одном из самых объёмных исследований, проведённом Xu et al. [17], изучали изменение работы системы Nrf2 в образцах печени крыс Sprague-Dawley, собранных в 11 возрастных точках (пренатальные (–2), а также 1, 7, 14, 21, 28, 35, 60, 180, 540 и 800 сут. после рождения). Показали, что экспрессия мРНК, определяемая RT-PCR этих генов (*Gclm*, *Nqo1*, *Ho-1*), равно как и Nrf2 и Kelch-подобного ECH-ассоциированного белка-1 (Keap1), была высокой в печени плода, снижалась при рождении, достигала первого пика в семидневном возрасте и затем постепенно снижалась до 6-месячного возраста ($p < 0,001$). Экспрессия всех этих генов оставалась на высоком уровне до возраста 18 мес., но затем снижалась до возраста 26 мес. Экспрессия белков (Вестерн-блоттинг) Nrf2, Nqo1, Ho-1, Gclc и Gclm изменялась сходным образом.

Smith et al. [20] показали, что в культивируемых гепатоцитах молодых (4–6 мес.) и старых (24–28 мес.) крыс Fischer 344 нет различий в уровне мРНК Nrf2 ($p > 0,05$). При этом содержание белка Nrf2 и базальная и индуцированная анетолтретионом (АЗТ) экспрессия Nrf2-зависимых генов была *ниже* в гепатоцитах старых животных. И, наоборот, сверхэкспрессия Nrf2 в клетках старых животных восстанавливала индукцию генов. Дополнительная серия экспериментов позволила выявить шесть микроРНК, содержание которых увеличивается с возрастом более чем в 2 раза ($p < 0,05$). Предполагается, что одна из них, miRNA-146a, связывает мРНК Nrf2. Трансфекция гепатоцитов молодых крыс-миметиком miRNA-146a вызывала ослабление трансляции Nrf2 на 55%, что соответствовало возрастной потере Nrf2 [20].

Спинной мозг. Duan et al. [8] изучали возрастные изменения экспрессии белков Nrf2, Ho-1, Nqo1 с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*.

Уровень белка Nrf2, а также белка Ho-1 (определяемых с помощью Вестерн-блоттинга) в астроцитах спинного мозга у 13-мес. мышей C57Bl6/J был вдвое *ниже*, чем у 1-мес. животных ($p < 0,05$). При этом не было выявлено различий в этих показателях у 1- и 5-мес. животных. Также не было выявлено достоверных различий в уровне экспрессии Nqo1 во всех исследованных возрастах. Кроме того, сравнивали уровни экспрессии этих белков в стационарной культуре астроцитов спинного мозга после 14, 30 и 60 сут. культивирования (с заменой среды 2 раза в неделю). Уровень экспрессии белка Nrf2 (а также белка Nqo1) в 60-сут. астроцитах был вдвое *ниже*, чем в 14-сут. клетках ($p < 0,05$). При этом достоверных различий в этих показателях в 14- и 30-сут. клетках выявлено не было. В отличие от Nqo1, уровень экспрессии белка Ho-1 в 30- и 60-сут. астроцитах был в 2,3 и 4 раза *ниже*, чем в 14-сут. клетках ($p < 0,05$).

Бронхи. Используя (видимо, впервые) первичные эпителиальные клетки бронхов человека от доноров разных возрастов, Zhou et al. [21] подтвердили предыдущие исследования других авторов, проведённые на животных, и показали, что базальная экспрессия белка NRF2 *ниже* у пожилых людей (60–69 лет), чем у молодых (25–29 лет). В то же время базальная экспрессия трёх репрезентативных генов-мишеней NRF2 (*GCLC*, *GCLM* и *NQO1*) была *выше* у пожилых, чем у молодых [21].

Мышцы. С возрастом у крыс Fischer 344 накапливаются дефектные митохондрии с повреждением митохондриальных крист, набуханием и образованием внутримитохондриальных вакуолей [22]. Уровень АФК был в 1,36 раза выше в ткани языка у старых крыс (22 мес.), чем у молодых (7 мес.), $p = 0,001$, а уровень белка Nrf2 (Вестерн-блоттинг) — в 1,75 раза *ниже* у старых животных (22 мес.) по сравнению с молодыми (7 мес.), $p = 0,021$ [22].

Сердечно-сосудистая система. С возрастом уменьшается активность связывания Nrf2–ARE в сердце [23]. Вестерн-блоттинг выявил почти трехкратное снижение уровня Nrf2 с возрастом ($1,0 \pm 0,18$ в ядерных экстрактах миокарда молодых мышей C57/Bl6/SJ (2 мес.) по сравнению с $0,35 \pm 0,12$ у старых (>23 мес.)). Также в сердце на 40% снижена экспрессия антиоксидантных генов-мишеней [23].

Возрастная дисфункция Nrf2 в эндотелиальных клетках изменяет передачу сигналов и способствует развитию сосудистых заболеваний [24]. Индукция программ старения в мозговых артериях связана с активацией широкого спектра воспалительных цитокинов и хемокинов, вносящих вклад в развитие ассоциированного

со старением секреторного фенотипа (SASP). Уровень экспрессии молекулярных маркёров старения (p16INK4a, p21) выше в мозговых артериях старых (24 мес.) мышей C57BL/6J, по сравнению с молодыми (3 мес.) [25].

Ungvari et al. [14] сравнивали уровень экспрессии мРНК и белка Nrf2 и его генов-мишеней в аорте 3-, 12-, 18-, 24- и 28-месячных крыс Fischer 344x Brown Norway (F344xBN). Анализ интенсивности ядерной флуоресценции с помощью редокс-чувствительного флуоресцентного красителя ди гидроэтидия (dihydroethidium, DHE) показал значительное возрастное увеличение продукции O_2^- в аорте крыс. Показали, что в сосудах старых крыс наблюдается преимущественно цитоплазматическое окрашивание на Nrf2, тогда как окрашивание на Nrf2 в ядре гораздо менее выражено, и этот показатель сходен в артериях молодых и старых животных (3 мес.). Таким образом, с возрастом сокращается именно ядерная фракция Nrf2, ответственная за связывание с ARE и активацию транскрипции ферментов антиоксидантной защиты и II фазы детоксикации. Уровень связывания Nrf2 с ARE (определяемый ELISA) в ядерных экстрактах артерий был вдвое *ниже* у 12-мес. крыс по сравнению с 3-мес. и сохранялся на этом уровне во всех исследованных возрастах ($p < 0,05$). Содержание ядерного Nrf2 в аорте снижается с возрастом параллельно со снижением общего (цитоплазма + ядро) уровня Nrf2, однако достоверное ($p < 0,05$) снижение мРНК (70% от уровня, характерного для 3-мес. крыс) и белка Nrf2 (30% от уровня, характерного для 3-мес. крыс) наблюдается лишь начиная с возраста 24 мес. Сходную возрастную динамику экспрессии мРНК (RT-PCR) и белка (Вестерн-блоттинг) наблюдали и для генов-мишеней Nrf2. У 24-мес. крыс по сравнению с 3-мес. крысами уровень экспрессии мРНК Gclc снижен до 60% ($p < 0,05$). Снижение уровня экспрессии мРНК Nqo1 и Ho1 до 70% и 60% соответственно было достоверным уже для 12-мес. животных ($p < 0,05$ по сравнению с 3-мес. крысами). Уровень экспрессии белка Gclc был снижен до ~70%, а Nqo1 — до 25% у 24-мес. крыс по сравнению с 3-мес. [14]. Ungvari et al. наблюдали, что базальный уровень мРНК Gclc в сегменте аорты оставался стабильным с 3 до 18 мес. и начинал снижаться с 24 мес. и индуцировался в ответ на H_2O_2 у молодых (3 мес.), но не старых (24 мес.) крыс.

В другом исследовании, проведённом в этой же лаборатории и с использованием тех же подходов, обнаружили значительное увеличение с возрастом уровня окислительного стресса [15]. В сонных артериях старых ($22,2 \pm 1,7$ года) ма-

как-резус *Macaca mulatta* по сравнению с молодыми ($10,5 \pm 0,9$ года) в 6 раз выше содержание 8-изо-PGF2 α (8-изопростагладина F2 α , биомаркёра перекисного окисления липидов). Также у них в 1,8 раза выше уровень 4-HNE (4-гидрокси-2-ноненаль [окисленный вторичный продукт, который образует стабильный аддукт с белками]) и усилено воспаление (повышена активность NF- κ B). Уровень антиоксидантов глутатиона и аскорбата при этом ниже соответственно в 4 и 8 раз у старых животных, чем у молодых. Однако это возрастное усиление окислительного стресса не вызывало активации Nrf2 (отсутствовали достоверные различия в уровне мРНК и белка Nrf2 и его генов-мишеней (Nqo1, Gclc и Ho-1). Возможно, это является следствием возраста сравниваемых животных (обезьяны, названные старыми, прожили лишь около половины своей видовой ПЖ) [15].

Основные данные по возрастному изменению активности Nrf2 приведены в таблице (см. далее). Видно, что, несмотря на данные промежуточных возрастов (возрастную динамику) и различия в выбранных возрастах [самых] молодых и старых животных, с возрастом практически во всех исследованных тканях имеет место снижение экспрессии мРНК и белка Nrf2 (и его генов-мишеней) в 2–4 раза. Наибольшее снижение показано для мышц, что соответствует их статусу наиболее метаболически активной ткани. Наиболее устойчивыми к уменьшению уровня Nrf2 оказываются, по всей видимости, клетки сосудистого эндотелия (таблица). Примечательно, что при получении из тканей разного возраста первичных культур (т.е. смены окружения) результаты могут быть прямо противоположными (см., например, [13, 21, 26–28]). В клетках, полученных из тканей старых животных, уровень мРНК и белка Nrf2 будет *выше*, чем в клетках от молодых животных, что согласуется с тем представлением, что Nrf2 активируется (а большинство регулирующих его систем в клетке инактивируются) окислительным стрессом (рис. 1). Аналогично, более высокому уровню окислительного стресса должны соответствовать и более высокий уровень Nrf2, и более высокий уровень продуктов индуцируемых им генов антиоксидантной защиты. Ещё одним интересным примером влияния окружения на систему Nrf2 являются физические упражнения. Так, в работе Safdar et al. [13] показано, что у пожилых (~70 лет) людей, ведущих активный образ жизни, уровень белка NRF2 не только не снижается по сравнению с таковым у взрослых, но даже повышается. Аналогичные данные получены для получающих физическую нагрузку крыс [26].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПОСОБНОСТИ СИСТЕМЫ Nrf2/ARE К АКТИВАЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО И ЭНДОГЕННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Культивирование клеток на среде с глюкозой.

С возрастом меняется способность клеток реагировать на окислительный стресс и способность к активации Nrf2 (как главного регулятора высокоскоординированного антиоксидантного ответа). В упомянутой выше работе Ungvari et al. [15], в культивируемых на ранних (четвёртом-пятом) пассажах клетках гладких мышц сосудов (vascular smooth muscle cells, VSMC) из молодых ($10,5 \pm 0,9$ года) *Mus musculus*, обработка глюкозой в высокой концентрации (30 мМ) или H_2O_2 (14–100 мкМ) значительно увеличивает транскрипционную активность Nrf2 и усиливает экспрессию генов-мишеней Nrf2. Напротив, в культивируемых клетках гладких мышц сосудов, полученных от старых макаков ($22,2 \pm 1,7$ года), индуцированная H_2O_2 и глюкозой в высокой концентрации, активность Nrf2 и экспрессия генов-мишеней Nrf2 не выражена. Это говорит о сниженной способности клеток старых животных реагировать на окислительный стресс. Ungvari et al. [14] изучали индукцию Nqo1 в аорте в ответ на H_2O_2 и глюкозу и обнаружили, что индукция Nqo1 снижалась в аорте старых крыс (24 мес. против 3 мес.). Также они продемонстрировали, что, хотя уровень экспрессии Nqo1 не изменялся, её индукция в ответ на H_2O_2 была невелика в сонной артерии и VSMC у старых (20 лет) по сравнению с молодыми макаками-резус (10 лет).

В VSMC, полученных от старых (24 мес.) крыс Fischer 344, уровень белка Nrf2 в ядре (но не в цитоплазме) был **выше**, чем в VSMC молодых (6 мес.) [27]. Это справедливо как для VSMC, выращенных в обычной среде (содержащей 5 мМ глюкозы) ($p = 0,02$), так и в среде с высоким содержанием глюкозы (12,5 мМ, $p = 0,01$). В VSMC, подвергнутых воздействию глюкозы (25 мМ, 24 ч), связывание Nrf2 с ARE было на $54,5 \pm 14,1\%$ **выше** в VSMC старых крыс; в то время как в контрольных VSMC (выращенных на 5 мМ глюкозе) оно было на $33,5 \pm 17,4\%$ **выше** в старом возрасте, приводя к более высокому уровню экспрессии гена *Gclc* [27]. Таким образом, у старых животных снижается как базальный ядерный уровень Nrf2, так и индукция в ответ на H_2O_2 и глюкозу.

Окислительный стресс в пигментном эпителии сетчатки (RPE). Моделирование возрастных дегенеративных изменений сетчатки важно для изучения роли окислительного стресса в патогенезе

возрастной дегенерации жёлтого пятна, одного из наиболее распространённых возрастных глазных заболеваний [28]. Sachdeva et al. [28] сравнивали RPE молодых (2 мес.) и старых (15 мес.) мышей C57Bl6/J в бесстрессовых и стрессовых (йодат натрия ($NaIO_3$, 5 мг/кг)) условиях. В бесстрессовых условиях в RPE старых (15 мес.) мышей уровень экспрессии (определяемый RT-qPCR) генов-мишеней Nrf2 (*Nqo1* и *Ho-1*) был соответственно в 11 и 10 раз **выше**, чем у молодых (2 мес.) ($p < 0,05$). Это указывает на возрастное усиление базального окислительного стресса и показывает, что RPE старых мышей более уязвимы к окислительному повреждению из-за нарушения передачи сигналов Nrf2. В RPE молодых мышей обработка $NaIO_3$ индуцировала 2,2-кратное увеличение уровня мРНК Nrf2 и соответствующее увеличение уровня транскриптов *Gclm*, *Ho-1* и *Nqo1* (в 2, 9 и 10 раз соответственно). Тем не менее $NaIO_3$ не стимулировал индукцию мРНК Nrf2 в RPE у старых мышей (15 мес.) ($p < 0,05$) [28]. Кроме того, в RPE старых мышей, подвергшихся воздействию йодата натрия, наблюдали более высокий уровень супероксид-аниона и малонового диальдегида, чем у молодых, что в совокупности свидетельствует о недостаточной защите от окислительного повреждения. Наоборот, сверхэкспрессия Nrf2 в RPE сохраняет морфологию клеток и улучшает выживаемость у мышей в моделях дегенерации сетчатки и является потенциальным терапевтическим средством для лечения заболеваний, связанных с дегенерацией RPE [29].

Компенсация возрастных изменений активаторами Nrf2. Одним из общепринятых способов компенсации такого рода снижения является применение веществ, активирующих Nrf2. Обычно это достигается за счёт применения соединений, взаимодействующих с тиольными группами цистеинов главного ингибитора Nrf2, Keap1 [7, 10, 30].

Липоевая кислота. Показано, что (R)-альфа-липоевая кислота индуцирует активацию Nrf2 *in vitro* и повышает уровень глутатиона *in vivo*, видимо, за счёт образования липоил-цистеинильных смешанных дисульфидов на ингибиторе Nrf2, Keap1, препятствующих его связыванию с Nrf2. Ещё одним предполагаемым механизмом является опосредованная через фосфорилирование протеинкиназой C активация Nrf2 [10]. У старых (24–28 мес.) крыс Fischer 344 липоевая кислота (40 мг/кг внутривенно) увеличивала уровень ядерного Nrf2, связывание Nrf2 с ARE и соответствующее повышение уровня *Gclc* (в 1,7 раза) (в то время как *Gclm* не индуцировалась), а также и активности Gcl (че-

рез 24 ч после введения) до уровня, наблюдаемого у молодых (2–5 мес.) животных [12].

Сульфорафан. Ещё один активатор Nrf2, содержащийся в крестоцветных изотиоцианат сульфорафан (в пище в течение 12 недель), вчетверо повышает уровень экспрессии мРНК Nrf2 (RT-qPCR) в сердце у старых мышей C57BL/6 (21–22 мес.) ($0,17 \pm 0,06$ и $0,67 \pm 0,13$; $p < 0,001$), а у молодых мышей — в 6 раз ($0,35 \pm 0,04$ и $2,12 \pm 0,50$; $p < 0,0001$), а в скелетных мышцах — в 2 раза у молодых мышей ($0,90 \pm 0,37$ и $1,77 \pm 0,82$; $p < 0,01$) и почти в 3,5 раза у старых мышей ($0,26 \pm 0,07$ и $0,90 \pm 0,40$; $p < 0,05$). Интересно отметить, что при этом уровень экспрессии Nrf2 у старых мышей, получавших сульфорафан с пищей, в 2 раза превышает (в сердце) и равен (в скелетных мышцах) уровню экспрессии Nrf2 у молодых здоровых мышей, не получавших сульфорафан. Связывание Nrf2/ARE (определяемое с помощью Nrf2-DNA-binding ELISA kit) *ниже* в 2,1 раза в сердце и в 1,9 раз в скелетных мышцах у старых мышей по сравнению с молодыми ($p < 0,001$). Сульфорафан улучшает также связывание Nrf2/ARE в 1,225 и в 1,17 раза ($p < 0,05$) у молодых мышей (в сердце и скелетных мышцах соответственно). Интересно, что, хотя уровень связывания Nrf2 у старых мышей, получавших с пищей сульфорафан, увеличился в 1,67 раза в сердце ($p < 0,01$) и в 2,08 раза в скелетных мышцах ($p < 0,001$), он не достиг уровня, характерного для молодых здоровых мышей, не получавших сульфорафан. Кроме того, сульфорафан улучшает общее физическое состояние организма: сердечную функцию, способность к физической нагрузке, митохондриальную функцию, толерантность к глюкозе и активацию/дифференцировку сателлитных клеток скелетных мышц до уровня, характерного для молодых (2 мес.) мышей [31].

Трет-бутилгидрохинон. Тем не менее эффективность активации Nrf2 также зависит от возраста. Время, в течение которого Nrf2 остаётся активным, зависит от стимула, генерируемого индуктором, а также от возраста животных. Так, трет-бутилгидрохинон (tBHQ) способствует связыванию Nrf2 с ARE лишь в течение 30 мин в первичных астроцитах, полученных от старых крыс Wistar (24 мес.). В то же время астроциты, выделенные из молодых (9 мес.) крыс, поддерживают этот ответ до 180 мин [32].

Инактивация Nrf2 в моделях возрастных патологий. Miller et al. [33] показали, что уровни мРНК и белка Nqo1 были резко ($p < 0,001$) снижены в скелетных мышцах у двухмесячных мышей *Nfe2l2*^{-/-} (далее обозначаемых *Nrf2*^{-/-}) по сравнению с мышами C57/BL6х дикого типа.

У старых мышей (>24 мес.) наблюдалось значительное повышение уровня АФК, а также снижение уровня глутатиона в скелетных мышцах у *Nrf2*^{-/-} по сравнению с молодыми. Кроме того, признаки окислительного стресса (уровень АФК, HNE-позитивных белков, убиквитинирования и проапоптотических сигналов) указывают на то, что скелетная мускулатура старых мышей гораздо более уязвима к нарушению регуляции пути Nrf2. Kitaoka et al. [34] продемонстрировали, что митохондриальные маркёры окислительного стресса (гидроксиноненаль и белковые карбонилы) были значительно повышены у старых мышей с нокаутом Nrf2 (*Nrf2*^{-/-}) из-за снижения экспрессии антиоксидантных генов Nrf2-мишеней. Митохондриальное дыхание снижалось с возрастом; однако не было различий между мышами *Nrf2*^{-/-} и дикого типа соответствующего возраста. Точно так же активность цитохромоксидазы *c* была ниже у старых мышей дикого типа и *Nrf2*^{-/-} по сравнению с молодыми мышами дикого типа. Продукция АФК митохондриями в расчёте на потребляемый кислород была увеличена у старых мышей *Nrf2*^{-/-}. Тем не менее нокаут *Nrf2* не влиял на возрастное снижение мышечной массы, приведённой к массе тела. Эти результаты предполагают, что дефицит Nrf2 усугубляет возрастной окислительный стресс митохондрий, но не влияет на снижение дыхательной функции в скелетных мышцах [34].

Возрастные нарушения слуха. Иммунореактивность Nrf2 обнаруживается у человека преимущественно в апикальной, медиальной и базальной областях, во внутренних и внешних волосковых клетках и поддерживающих клетках кортиева органа в улитке [35, 36]. Для изучения возможных возрастных различий иммунореактивности Nrf2 в кортиевом органе у людей 18–92 лет, разделённых на группу взрослых (<70 лет) и пожилых (70–92 года). Для каждого образца средние значения площади иммунореагировавшей области усредняли и подвергали одностороннему повторному анализу измерений (ANOVA). Показали, что иммунореактивность Nrf2 в кортиевом органе сохраняется и у самого старого человека в рассмотренной группе (92 года), но снижена на 20% у пожилых (в группе старше 70 лет, $p \leq 0,0372$) [36]. Потеря слуха, вызванная шумом (noise-induced hearing loss, NIHL), является одним из наиболее распространённых нейросенсорных нарушений слуха. Патогенез NIHL тесно связан с ишемическим реперфузионным повреждением улитки, которое вызвано уменьшением кровотока и выработкой свободных радикалов из-за чрезмерного шума [35]. Повреждение и потеря волосковых клеток, вызванные окислительным стрес-

сом, считаются важными причинами потери слуха и тесно связаны с антиоксидантным статусом клетки и Nrf2 [35, 36]. Нокаут *Nrf2* делает органы слуха (и волосковые клетки, в частности) гораздо более чувствительными к воздействию шума [37]. Нарушение слуха через 7 дней после воздействия были значительно больше у мышей *Nrf2*^{-/-}, чем у мышей дикого типа. Активатор Nrf2, CDDO-Im (2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9-диен-28-имидазол), при применении до, но не после воздействия шума, сохранял целостность волосковых клеток и улучшал уровень слуха после воздействия у мышей дикого типа, но не оказывал воздействия у мышей *Nrf2*^{-/-}. Это подтверждает эффективность активации Nrf2 для предотвращения NIHL за счёт защиты улитки от повреждений, вызванных шумом [38].

Valcarcel-Ares et al. [39] показали, что подавление сигнального пути Nrf2 (нокдаун siRNA Nrf2 или сверхэкспрессия ингибитора Nrf2 — Keap1) нарушает ангиогенные процессы в культивируемых коронарных артериях эндотелиальных клеток человека, вызывает нарушение пролиферации и адгезии к гликопротеину витронектину и коллагену в эндотелиальных клетках коронарных артерий. Нарушение передачи сигналов Nrf2 также снижает клеточную миграцию и нарушает способность эндотелиальных клеток коронарных артерий формировать капилляроподобные структуры [39].

Клеточное старение и экспрессия молекулярных маркеров старения. Kapeta et al. [40] изучали функцию Nrf2 в модели репликативного старения фибробластов лёгких человека HFL-1. Кратко, фибробласты пересевали (1 : 2) по достижении монослоя и через определенное число удвоений клеточной популяции (УКП, определяемое по формуле $\ln(N_f/N_i)/\ln 2$, где N_f — конечное количество клеток после посева, а N_i — начальное количество посеянных жизнеспособных клеток) становятся репликативно старыми (неспособными за определенный срок удвоить свою численность). В репликативно старых фибробластах HFL-1 (42 УКП) был выше уровень окислительного стресса и признаков старения (процент клеток, окрашиваемых на ассоциированную со старением β -галактозидазу, и уровень экспрессии белков-маркеров старения (p16INK4a, p21)) [40]. Также в HFL-1 снижены уровень белка (~65%) и мРНК (45%) Nrf2 по сравнению с молодыми, а также уровень экспрессии *Nqo1*, гена-мишени Nrf2. В дополнительной серии экспериментов показали, что молодые фибробласты HFL-1, обработанные индуктором Nrf2, тритерпеноидом 18-глициретиновой кислотой, не становятся

сенесцентными (в отличие от контрольных). Действие этого вещества опосредуется системой Nrf2/Keap1, втрое повышая уровень Nrf2 и втрое понижая уровень Keap1 [40].

В соответствии с этим, *Nrf2*^{-/-}-фибробласты имеют короткую ПЖ [41]. Кроме того, Jydar et al. [41] показали, что *Nrf2*^{-/-} эмбриональные фибробласты мыши (MEF) склонны к иммортализации после 15 УКП. Напротив, показано, что селективные активаторы Nrf2, такие как рапамицин [42], предотвращают клеточное старение и даже увеличивают ожидаемую ПЖ в нормальных MEF [43]. Регулируемые Nrf2 ферменты, такие как супероксиддисмутаза 1 (Sod1), также способны предотвращать старение и воспаление в некоторых условиях [44]. Сенесцентные клетки, в свою очередь, способствуют возрастной патологии и потере функции, а их избирательное удаление улучшает физиологическую функцию и увеличивает ПЖ [42]. В мозговых артериях 24-месячных мышей уровень экспрессии p16INK4a и p21 повышен по сравнению с таковым у молодых контрольных животных [25].

Corenblum et al. [45] показали, что, хотя функция предшественников стволовых нервных клеток (neural stem progenitor cells, NSPC) постоянно снижается с возрастом у крыс Fisher 344, существует критический период времени в среднем возрасте (13–15 мес.), когда происходит резкое снижение выживаемости и регенерации NSPC. Этот специфический временной паттерн ухудшения NSPC сопровождается снижением экспрессии Nrf2 ($p < 0,05$), после чего (как и до этого возраста) не наблюдается значимых изменений этого показателя, до возраста 26 мес. При подавлении экспрессии Nrf2 в «молодых» NSPC (с помощью коротких интерферирующих РНК) выживание и регенерация NSPC значительно нарушается. Напротив, сверхэкспрессия Nrf2 в «старых» NSPC делает их похожими на «молодые», и они демонстрируют повышенную выживаемость и регенерацию. Кроме того, пролиферативный и нейрогенный потенциал NSPC также нарушен у мышей *Nrf2*^{-/-} [45].

В ещё одной модели старения, вызванного окислительным стрессом (SIPS, stress-unduced premature senescence), признаки клеточного старения были менее выражены (по сравнению с контролем) при инактивации ещё одного ингибитора Nrf2, кавеолина-1, препятствующего перемещению Nrf2 в ядро (с увеличением в 2 раза уровня экспрессии Nrf2). Интересно, что угнетающее действие кавеолина-1 на Nrf2 не опосредуется активностью Keap1 [46].

Связь активности Nrf2 с продолжительностью жизни и долголетием. Nrf2 является важным ре-

гулятором ПЖ [47–50]. Предполагается, что долгоживущие виды имеют активный цитопро-тективный путь Nrf2. Сверхэкспрессия ниже-лежащих компонентов сигнального пути Nrf2 продлевает ПЖ дрозиды [48]. Долгоживущие модели *Caenorhabditis elegans* также демонстрируют повышенную экспрессию Skn-1, гомолога Nrf2 [49]. Активность Nrf2 является важным регулятором ПЖ и у позвоночных [50]. Тем не менее общий белок Nrf2 не обязательно уменьшается с возрастом. Так, например, уровень белка Nrf2 (и его транслокация в ядро) были сходными в сердце у взрослых и старых крыс в отсутствие окислительного стресса (однако эффективность связывания Nrf2–ARE была нарушена, снижая экспрессию основных антиоксидантных ферментов-мишеней (Ho-1, Gst и Gcl) [51].

Также и содержание Nrf2 у долгоживущего голубого землекопа *Heterocephalus glaber* было сопоставимым с таковым у других видов грызунов с меньшей видовой ПЖ [5]. Lewis et al. [5] предположили, что защитная функция зависит не столько от содержания Nrf2, сколько от его активности. Важным событием в этом случае является снижение уровня Keap1, позволяющее избежать убиквитинирования Nrf2 и последующей протеасомной деградации. Кроме того, они также предположили важную роль двух других регуляторов Nrf2: p62/SQSTM1 (белка, связанного с аутофа-

гией и противодействующего протеасомной деградации Nrf2) и β -TrCP (E3 убиквитинлигазы), способствующего протеасомной деградации Nrf2 [5] (см. далее). Из других физиологических адаптаций, связанных с Nrf2, можно отметить повышение в 1,5 раза у 13-полосного суслика *Spermophilus tridecemlineatus* конститутивного уровня Nrf2, а также нижележащих компонентов пути Nrf2 при подготовке к спячке, и возвращение этих показателей к нормальному уровню после возвращения к активному образу жизни [52].

Основные данные по возрастному изменению уровня белка Nrf2 приведены на рис. 2. Видно, что, несмотря на данные промежуточных возрастов (возрастную динамику) и различия в выбранных возрастах [самых] молодых и старых животных, с возрастом снижение белка Nrf2 выражено в меньшей степени в печени (основном месте антиоксидантной защиты и детоксикации организма), причём содержание белка не падает *ниже* 50% от исходного уровня. Постоянным снижением характеризуется содержание белка Nrf2 в сердечно-сосудистой системе, тогда как органы нервной системы занимают промежуточное положение.

Далее мы сопоставили эти данные с изменением других этапов активации Nrf2 (включая уровень экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего Nrf2, и его генов-мишеней, а также связывание Nrf2 с ARE). Результаты собраны в итоговой таблице.

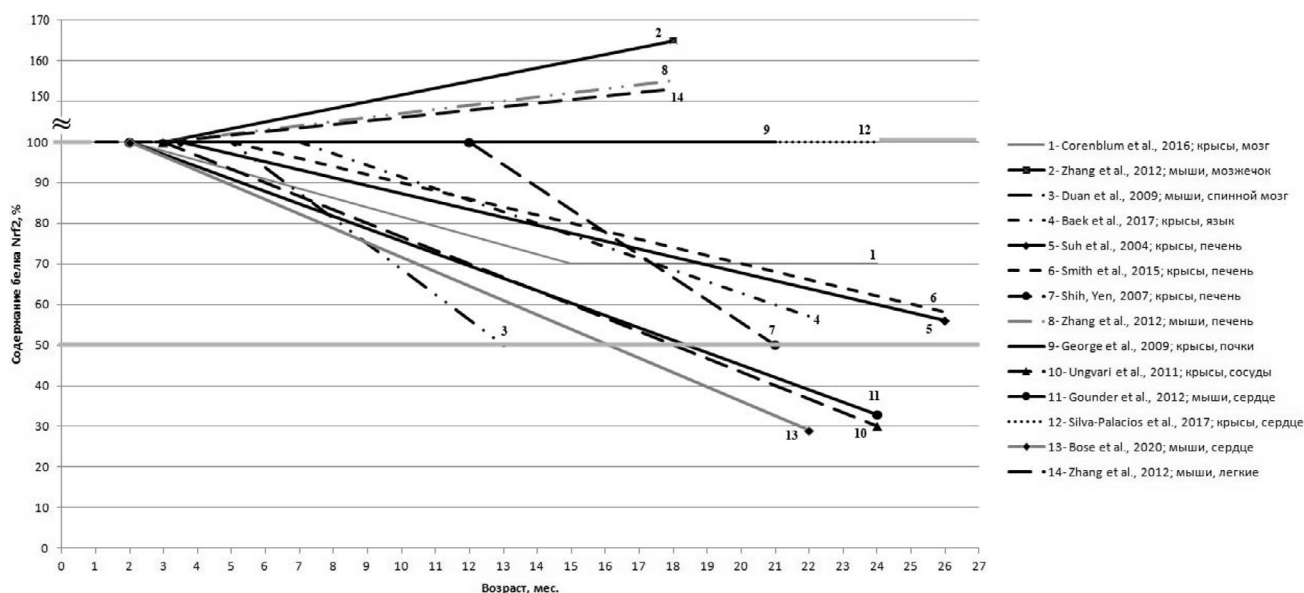


Рис. 2. Возрастные изменения содержания белка Nrf2 у лабораторных крыс и мышей. За 100% принят уровень белка Nrf2 у молодых животных. Представлены данные следующих работ: 1 — Corenblum et al. [45], мозг; 2 — Zhang et al. [67], мозг (мозжечок); 3 — Duan et al. [8], спинной мозг; 4 — Baek et al. [22], язык; 5 — Suh et al. [12], печень; 6 — Smith et al. [20], печень; 7 — Shih and Yen [19], печень; 8 — Zhang et al. [67], печень; 9 — George et al. [26], почки; 10 — Ungvari et al. [14], сосуды; 11 — Gounder et al. [23], сердце; 12 — Silva-Palacios et al. [51], сердце; 13 — Bose et al. [31], сердце; 14 — Zhang et al. [67], лёгкие

Возрастные изменения экспрессии Nrf2 и его генов-мишеней

Орган/(объект)	Молодые, мес.	Старые, мес.	Уровень белка и мРНК Nrf2 (у старых животных по сравнению с молодыми)	Уровень экспрессии генов-мишеней Nrf2 (у старых животных по сравнению с молодыми)	Ссылка
Печень (крысы Fischer 344)	4–6	24–28	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> на 42%; нет различий в уровне мРНК	уровень мРНК Gclc, Gclm и Gst2a <i>ниже</i> на 19,6%, 31,4% и 40% соответственно	[20]
Печень (крысы Fischer 344)	2–5	24–28	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 1,79 раза для общего белка Nrf2 и в 2 раза – для его ядерной фракции	связывание Nrf2 с ARE <i>ниже</i> на ~40%	[12]
Печень (крысы Sprague-Dawley)	2	18–24	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 2 раза	уровень экспрессии составлял 60%, 62%, 69% для глутатионредуктазы, Nqo1 и каталазы соответственно	[19]
Печень (крысы Sprague-Dawley)	2–5	24–28		связывание Nrf2 с ARE Gclc <i>ниже</i> (50 ± 17% от такового у молодых)	[68]
Печень (крысы Sprague-Dawley)	6	26	уровень экспрессии гена Nrf2 <i>не различается</i> у 6-мес. и 26-мес. крыс	экспрессия генов Gclm, Nqo1, Gclc, Ho-1 <i>не различается</i> у 6-мес. и 26-мес. крыс	[17]
Скелетные мышцы (крысы Fischer 344)	7	22	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 1,75 раза		[22]
Скелетные мышцы и сердце (мыши C57BL/6)	2	22	уровень мРНК Nrf2 в 3,5 раза <i>ниже</i> в мышцах и в 2 раза в сердце	связывание Nrf2/ARE <i>ниже</i> в 2,1 раза в сердце и в 1,9 раз – в скелетных мышцах; в сердце уровень мРНК Gclc <i>ниже</i> в 2 раза, Gclm – <i>ниже</i> в 1,5 раза; в скелетных мышцах уровень Gclc <i>не менялся</i> , Gclm – <i>ниже</i> в 1,5 раза	[31]
Сердце (мыши C57BL/6/SJ)	2	23	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 3 раза	связывание Nrf2/ARE <i>ниже</i> в 1,65 раза	[23]
Сердце (крысы Wistar)	9	24	уровень белка Nrf2 не менялся		[51]
Сосуды (макака-резус)	126	264	<i>нет возрастных различий</i> в уровне мРНК и белка Nrf2	<i>нет возрастных различий</i> в уровне мРНК и белка генов-мишеней Nrf2 (Nqo1, Gclc и Ho-1)	[15]
Сосуды (крысы F344xBN)	3	24	уровень мРНК Nrf2 в 1,4 раза <i>ниже</i> ; уровень белка Nrf2 в 3,3 раза <i>ниже</i>	уровень связывания Nrf2 с ARE вдвое <i>ниже</i> у старых крыс	[14]
Сосуды (крысы Fischer 344)	6	24	в первичной культуре эндотелия сосудов старых крыс уровень белка Nrf2 в 1,5 раза <i>выше</i> в ядре (но не в цитоплазме)	в первичной культуре эндотелия сосудов старых крыс связывание Nrf2 с ARE <i>выше</i> на 33,5 ± 17%	[27]
Спинальный мозг (мыши ICR)	5	13	уровень белка Nrf2 вдвое <i>ниже</i>	уровень белка Ho-1 в спинном мозге вдвое <i>ниже</i> , у Nqo1 изменений нет	[8] [28]
Пигментный эпителий сетчатки (мыши C57Bl6/J)	2	15		в первичной культуре эпителия сетчатки уровень экспрессии Nqo1 и Ho-1 соответственно в 11 и 10 раз <i>выше</i>	
Бронхи (человек)	21–29*	60–69*	уровень белка Nrf2 в первичной культуре бронхиального эпителия в 1,34 раза <i>ниже</i>	уровень белка в 1,8, 2,2 и 2,5 раза <i>выше</i> (для GCLC, GCLC и NQO1 соответственно)	[21]

Примечание. ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); Gclc – каталитическая субъединица глутаматцистеинлигазы; Gclm – регуляторная субъединица глутаматцистеинлигазы; Ho-1 – гемоксигеназа 1; Nqo1 – NAD(P)H:хинооксидоредуктаза 1.

* Лет.

Регуляторы пути Nrf2. Системы, подавляющие активность Nrf2, представляют собой компоненты программы старения [4]. Наиболее известными из них, как уже отмечалось, являются редокс-зависимая система Keap1 и редокс-независимая система белка, содержащего β -трансдукционные повторы и киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) (рис. 1). Кроме того, ещё одним белком, подавляющим действие Nrf2, является с-Мус [53] (рис. 1). Белок Bach1, не являясь прямым ингибитором Nrf2, конкурирует с ним за связывание с последовательностью ARE [10]. Кроме упомянутого выше, воздействие и других киназ (например, Gyn-киназы), может приводить к инактивации Nrf2 и его экспорту из ядра [54].

Keap1. Keap1 является основным регулятором активности Nrf2 [54]. Хотя сообщалось, что мыши *Keap1*^{-/-} нежизнеспособны и умирают в течение первых 3-х недель жизни [55], подавление Keap1 повышает устойчивость к токсинам и в некоторых случаях увеличивает ПЖ у таких видов, как *Drosophila melanogaster* [56]. Интересно, что у наиболее эволюционно продвинутой части птиц (таксон Neornithes) Keap1 подвергся столь серьёзным перестройкам, что практически утратил способность ингибировать Nrf2 [57]. Получившаяся в результате конститутивная активация Nrf2 (и индуцируемых им антиоксидантных ферментов) очень важна для животных со столь быстрым метаболизмом [57, 58]. Также уровень белка Keap1 не различается у быстро стареющих мышей SAMP8 и «устойчивых к старению» мышей SAMR1 [18]. Не было выявлено возрастных изменений уровня мРНК Keap1 у 10–50-дневных дрозофил [58]. Сообщается, что избыточный уровень Keap1 пагубно влияет на клеточный гомеостаз, и наоборот, в моделях преждевременного старения уровень Keap1 увеличивается [59–61]. Palsamy et al. [61] продемонстрировали, что ответ на несвёрнутые белки, стимулированный стрессорами и оксидантами эндоплазматического ретикулума, вызывал потерю метилирования промотора Keap1 и повышал экспрессию Keap1, тем самым снижая экспрессию генов-мишеней NRF2 и NRF2 в эпителии хрусталика человека. При этом метилирование промотора Keap1 снижается в хрусталике при старении, достигая самого низкого уровня в возрасте около 75 лет, создавая, таким образом, предпосылки для роста уровня экспрессии Keap1 с возрастом [61]. Тем не менее в работах Safdar et al. [13] и Xu et al. [17] не наблюдали возрастного повышения уровня Keap1.

Кроме того, Keap1 может быть критическим регулятором клеточного цикла и независимо от Nrf2. Истощённые по Nrf2 клетки обнаруживают существенное нарушение регуляции мито-

хондриального гомеостаза из-за Keap1-обусловленной деградации белка Mito2 [62]. Также показано, что Keap1 негативно регулирует пролиферацию эндотелиальных клеток и вызывает их старение [59, 60]. В дополнительной серии экспериментов в упоминавшейся выше работе Sachdeva et al. [28] изучали последствия генетической инактивации Keap1 в RPE у молодых (2 мес.) и среднего возраста (15 мес.) мышей C57Bl6/J в бесстрессовых и стрессовых (йодат натрия, 5 мг/кг) условиях [28]. Сравнивали индуцируемый окислительным стрессом уровень экспрессии Nrf2 и его генов-мишеней у мышей с трансгеном рекомбиназы Cre, индуцируемый тамоксифеном (Tam-Cre; Keap1loxP) и мышей того же возраста Keap1loxP, экспрессирующими уровни Keap1 дикого типа [28]. Тамоксифен снижал экспрессию Keap1 на 50% (как было определено с помощью количественной RT-qPCR у мышей Tam-Cre Keap1loxP по сравнению с мышами Keap1loxP, у которых отсутствовал трансген рекомбиназы Cre, индуцируемый тамоксифеном). Обработка NaIO₃ индуцировала в 2,5 раза более высокий уровень экспрессии гена-мишени Nrf2 *Nqo1* у старых (15 мес.) мышей по сравнению с молодыми ($p < 0,05$), что свидетельствует о частичном восстановлении нарушенного ответа Nrf2 на окислительный стресс в RPE. Транскрипты *Gclm* и *Ho-1* не были изменены при нокдауне Keap1 у 15-мес. мышей. У старых мышей с уровнем Keap1, характерным для дикого типа (Keap1loxP), обработка NaIO₃ не вызывала экспрессию *Nqo1*, что согласуется с данными, приведёнными выше. При этом индукция пути Nrf2 в ответ на йодат натрия была частично восстановлена в RPE старых (15 мес.) мышей C57Bl6/J с помощью нокдауна Nrf2-негативного регулятора Keap1 (Tam-Cre; Keap1loxP) по сравнению с мышами Keap1loxP. Эти данные показывают, что старые RPE более уязвимы к окислительному повреждению из-за нарушения сигнального пути Nrf2, активация которого представляется многообещающим способом для новых фармакологических или генетических терапевтических стратегий [28]. Клиническое значение дисбаланса Nrf2/Keap1 может быть связано с возрастными заболеваниями [60].

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ Nrf2/ARE В МЕХАНИЗМАХ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ, СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ

Говоря о принадлежности того или иного белка к участникам «программы старения» или

«программы антистарения», обычно имеют в виду следующие его свойства: увеличение содержания (активности) с возрастом, участие в развитии возрастных патологий и противодействие клеточным процессам репарации и антиоксидантной защиты (для Keap1 таким действием является связывание с Nrf2 с последующей протеасомной деградацией последнего). При этом (сверх)активация Keap1 приводит к ухудшению работы антиоксидантной системы клетки. Кроме того, хотя для Keap1 и показана возможность импорта/экспорта из ядра [62], подавляющая часть активности Keap1 приходится на цитоплазму. Вместе с тем из анализа работ видно, что чаще всего возрастному снижению в большей степени подвержена не цитоплазматическая, а ядерная фракция Nrf2.

Таким образом, можно сделать вывод, что Keap1, несмотря на то что он является наиболее мощным ингибитором Nrf2 и (вследствие этого) главной мишенью для фармакологического вмешательства [30], не может быть в полной мере признан белком «программы старения». В качестве таковых, видимо, следует рассматривать белки, ответственные за транспорт Nrf2 в ядро и за его активность в качестве фактора транскрипции.

Bach1 и с-Мус. Предполагается, что ARE-опосредованная экспрессия генов зависит от ядерного баланса между Nrf2 и Bach1 [63]. Bach1 подавляет экспрессию генов, конкурируя с Nrf2 за связывание с сайтом ARE в промоторе регулируемых генов, что, в частности, приводит к потере индуцибельности некоторых из Nrf2-регулируемых генов [64]. Уровень гема влияет на внутриклеточное распределение Bach1, его экспорт из ядра и активацию экспрессии Ho-1 [65]. Остатки C557 и C574 в Bach1 участвуют в диссоциации комплекса ARE/Ho-1, что указывает на зависимости активности Bach1 от окислительно-восстановительного статуса клетки [66]. Уровень Bach1 увеличивается с возрастом: у старых мышей C57BL/6J (21 мес.) он *выше*, чем у молодых (6 мес.) [67]. Аналогично в клетках бронхиального эпителия пожилых людей (67–69 лет) содержание BACH1 также *выше*, чем у молодых (28–29 лет) [21]. Shenvi et al. [68] обнаружили, что связывание Nrf2 с ARE Gclc значительно *ниже* ($50 \pm 17\%$, $p \leq 0,05$) у старых (24–28 мес.) крыс Fischer 344 по сравнению с молодыми (2–5 мес.) и что активность транскрипционного ответа ARE снижается при старении в присутствии Bach1. Кроме того, показано увеличение уровня базального белка с-Мус и Bach1 с возрастом во всех тканях: с-Мус повышался на 170% в мозжечке, на 87% в печени и на 90% в лёгких; Bach1 был увеличен на 80% в мозжечке,

на 50% в печени и на 150% в лёгких. Хроническое воздействие частиц выхлопного газа (nPM) увеличивало уровень с-Мус в тканях 6-месячных мышей, но не у более старых. Напротив, Bach1 не был увеличен nPM в тканях 6-месячных мышей, но был индуцирован nPM у более старых мышей [67].

p62. Белок p62/sequestosome1 (SQSTM1), адаптер, который связывает и доставляет в аутофагосомы убиквитинированные белки во время аутофагии и имеет сходный (STGE) мотив с Keap1-взаимодействующим мотивом ETGE в Neh2-домене Nrf2. Этот мотив делает возможным прямое взаимодействие между p62 и Keap1, вследствие чего p62 секвестрирует Keap1 в аутофагосомы для его последующей деградации [69]. Видимо, аутофагия может быть ещё одной критической точкой для регуляции Nrf2 при старении. Известно, что экспрессия p62 снижается с возрастом [70] и что потеря и/или уменьшение этого белка ведёт к уменьшению ПЖ [71]. У мышей *p62*^{-/-} наблюдается ускоренное развитие старческого фенотипа, в тканях этих мышей создаётся прооксидантная среда из-за нарушения транспорта электронов в митохондриях.

GSK3β. Фосфорилирование киназой GSK3β зачастую приводит к последующему убиквитинированию модифицированного белка и опосредуемой соответствующими адаптерами (например, F-box-белками) протеасомной деградации. Активность GSK3β увеличивается с возрастом *in vivo* и *in vitro*. Так, базальный уровень неактивного белка GSK3 у старых (18 мес.) сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) намного *ниже*, чем у молодых (1–3 мес.) [72]. Доля неактивной изоформы также вдвое *ниже* у самок в возрасте 1,5 года, чем у трёхнедельных [73]. Кроме того, в возрасте 10 мес. активность Akt и GSK3β значительно *выше* в печени мышей SAMP8, чем у SAMR. Предполагается, что вызванное повышением активности GSK3β уменьшение транслокации Nrf2 в ядро может приводить к увеличению окислительного стресса у мышей SAMP8 [18]. Показано, что в стационарной культуре первичных нейронов коры головного мозга мыши при практически неизменном общем уровне GSK3β доля фосфорилированной по S9 (т.е. неактивной) формы GSK3β снижалась с более чем 30% через 3 сут. культивирования без пересева до 15% — через 12 сут. [73]. «Старые» фибробласты человека WI-38 (диапазон числа удвоений клеточной популяции, УКП — 58–64), в отличие от клеток «среднего возраста» (УКП 38–41) и «молодых» (диапазон УКП — 26–30), проявляют признаки, типичные для старения, включая увеличенный размер, уплощённую форму и повышенный уровень ак-

тивности ассоциированной со старением β -галактозидазы, которые практически отсутствуют в клетках «молодого» и «среднего возраста». В отличие от «молодых» и клеток «среднего возраста», в ядрах «старых» клеток повышен уровень обеих изоформ GSK3 – GSK3 α и GSK3 β [74]. Ещё одним подтверждением участия GSK3 β в программе старения можно считать изменение её активности при возрастных заболеваниях. В нейронах она избирательно фосфорилирует тау-белок в участках, которые являются гиперфосфорилированными в мозге при болезни Альцгеймера (БА) [75]. В ткани мозга пациентов с БА уровень белка GSK3 β повышен на 50% [75]. Ингибирование GSK3 β уменьшает когнитивные дефициты, ассоциированные с БА и другими вышеупомянутыми заболеваниями. Активность GSK3 β увеличена в клеточной (при депривации ростовых факторов) и животной (церебральная ишемия) моделях нейродегенерации [76]. Провоспалительный эффект GSK3 β обусловлен стимуляцией продукции IL- β , IFN- γ , IL-6, IL-12 и подавлением синтеза IL-10 [77]. Интерес к этой киназе в рамках нашей статьи продиктован её регуляторным влиянием на Nrf2, осуществляемым по меньшей мере тремя способами: i) GSK3 (с участием адаптера β TrCP) напрямую связана с деградацией Nrf2, способствуя его убиквитинированию и протеасомной деградации (а не просто инактивации, как другие киназы); ii) GSK3 управляет ультрадианными ритмами Nrf2: фосфорилирует Gyn-киназу, которая перемещается в ядро, модифицирует там Nrf2, после чего Nrf2 удаляется из ядра; и iii) GSK3 фосфорилирует белки положительной ветви регуляции циркадных биоритмов Bmal1 и Clock, также вызывая их протеасомную деградацию, что снижает экспрессию Nrf2 (следует отметить, что в промоторах как генов негативных регуляторов биоритмов *Cry1*, *Cry2* и *Rev-erba*, так и в самом гене *Nfe2l2*, кодирующем Nrf2, содержится E-box, вследствие чего их транскрипция позитивно регулируется комплексом Clock/Bmal1 [9, 78]). Все вышеперечисленное косвенно подтверждает предложенную роль GSK3 β как явного представителя программы старения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение связано с увеличением производства АФК и повышенным окислительным стрессом с одновременным снижением активности основных антиоксидантов (супероксиддисмутаза, каталазы, глутатиона), что способствует развитию широкого спектра заболева-

ний [24]. Эволюционно консервативный путь антиоксидантного ответа, опосредуемый Nrf2, поддерживает клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз и способствует сохранению молодого клеточного фенотипа, регулируя транскрипцию ряда цитопротекторных генов. Уровень экспрессии Nrf2 снижается с возрастом как *in vivo*, так и *in vitro*, что ведёт к усилению окислительного стресса. Возрастные изменения могут приводить к нарушению уровня экспрессии генов-мишеней Nrf2 (*Nqo1*, *Ho-1*, *Gcl*) вследствие снижения общего уровня мРНК и белка, уменьшения его содержания в ядре, ухудшения связывания Nrf2 с элементом антиоксидантного ответа (ARE), негативной регуляцией экспрессии, опосредованной Nrf2. Таким образом, нарушение работы системы антиоксидантной защиты у старых животных из-за дефицита Nrf2 может привести к пагубному накоплению АФК [22]. Генетическая инактивация Nrf2 усиливает возрастную индукцию маркеров старения и воспалительных факторов SASP [25] и ускоряет клеточное старение, вызывая хроническое воспаление [25, 79, 80]. У Nrf2-дефицитных мышей также повышена чувствительность к ряду фармакологических и экологических токсичных веществ [81]. Недостаточная активность пути Nrf2 играет важную роль в возникновении и развитии ряда токсических и хронических заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Животные с дефицитом Nrf2 более уязвимы к развитию возрастных заболеваний, таких как болезни сердца [82], атрофия скелетных мышц [83], рак [46], нарушение зрения [84], наряду с сокращением ПЖ и преждевременным старением [46]. Так, возрастное снижение синтеза основного антиоксиданта клетки, глутатиона, может быть вызвано нарушением регуляции ARE-опосредованной экспрессии генов, но нацеленные на Keap1 хемопротекторные агенты, такие как липоевая кислота, сульфорафан и другие известные активаторы Nrf2, могут лишь (с возрастом всё хуже и хуже) компенсировать эту потерю [30, 85–92], подавляя опосредованный Keap1 путь деградации, но не предотвратить её. Наиболее вероятными претендентами на роль «серого кардинала», исподволь определяющего возрастное снижение функции Nrf2, претендует тройка c-Myc, GSK3 β и Bach1.

Таким образом, помимо сравнения работы защитных систем у коротко- и долгоживущих видов [2, 5, 6, 57, 93–98] и поиска новых антиоксидантов [99–101] и активаторов Nrf2 [30, 85–89], ещё одним перспективным направлением биogerонтологических исследований может быть конструирование и синтез веществ, обладающих множественным действием. Известны,

например, вещество, являющееся гибридом сульфорафана (активатора Nrf2) и мелатонина (регулятора биоритмов) [102], а также вещества, являющиеся одновременно ингибиторами GSK3 β и активаторами Nrf2 (2,4-дигидропирано[2,3-с]пиразолы) [103] или разных путей инактивации Nrf2 (GSK3 β , FYN, и DYRK1A) [104]. То. сигнальный путь Nrf2 (как главного регулятора высокоскоординированного антиоксидантного ответа) может быть потенциальной терапевтической мишенью для защиты клеток от возрастного накопления АФК путём восстановления окислительно-восстановительного гомеостаза для предотвращения возрастных патологий. Кроме того, будущие исследования передачи сигналов Nrf2 у людей и способности

различных веществ, активирующих путь Nrf2, предотвращать хронические возрастные заболевания, связанные со старением, позволят глубже понять роль активации Nrf2 как возможного вмешательства, способствующего долголетию.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-13037).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95-109, doi: 10.2174/1874609808666150422122401.
- Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: From naked mole rats to “naked apes” (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
- Skulachev, V. P. (2019) Phenoptosis as a phenomenon widespread among many groups of living organisms including mammals (Commentary to the paper by E. R. Galimov, J. N. Lohr, and D. Gems (2019), *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433-1437), *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1438-1441, doi: 10.1134/S0006297919120022.
- Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., et al. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
- Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., et al. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi: 10.1073/pnas.1417566112.
- Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., et al. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
- Cuadrado, A. (2015) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 147-157, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029.
- Duan, W. S., Zhang, R. Y., Guo, Y. S., Jiang, Y. F., Huang, Y. L., et al. (2009) Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **45**, 388-397, doi: 10.1007/s11626-009-9194-5.
- Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., et al. (2021) A crosstalk between the biorhythms and gatekeepers of longevity: dual role of glycogen synthase kinase-3, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 433-448, doi: 10.1134/S0006297921040052.
- Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., et al. (2015) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 108-146, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., et al. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, **7**, 11624, doi: 10.1038/ncomms11624.
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., et al. (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3381-3386, doi: 10.1073/pnas.0400282101.
- Safdar, A., deBeer, J., and Tarnopolsky, M. A. (2010) Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1487-1493, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.010.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., Gautam, T., Koncz, P., et al. (2011) Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, 363-372, doi: 10.1152/ajpheart.01134.2010.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Gautam, T., Sosnowska, D., Wang, M., et al. (2011) Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 866-875, doi: 10.1093/gerona/glr092.
- Zhang, H., Davies, K. J. A., and Forman, H. J. (2015) Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **88** (Pt B), 314-336, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036.
- Xu, S. F., Ji, L. L., Wu, Q., Li, J., and Liu, J. (2018) Ontogeny and aging of Nrf2 pathway genes in livers of rats, *Life Sci.*, **203**, 99-104, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.018.
- Tomobe, K., Shinozuka, T., Kuroiwa, M., and Nomura, Y. (2012) Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3 β in a mouse model of accelerated aging (SAMP8), *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **54**, 1-7, doi: 10.1016/j.archger.2011.06.006.
- Shih, P. H., and Yen, G. C. (2007) Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway, *Biogerontology*, **8**, 71-80, doi: 10.1007/s10522-006-9033-y.

20. Smith, E. J., Shay, K. P., Thomas, N. O., Butler, J. A., Finlay, L. F., et al. (2015) Age-related loss of hepatic Nrf2 protein homeostasis: potential role for heightened expression of miR-146a, *Free Radic. Biol. Med.*, **89**, 1184-1191, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.003.
21. Zhou, L., Zhang, H., Davies, K. J. A., and Forman, H. J. (2018) Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells, *Redox Biol.*, **14**, 35-40, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.014.
22. Baek, M. K., Lee, H., Kim, K. O., Kwon, H. J., Chung, M. H., et al. (2017) Age-related changes in nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and reactive oxygen species and mitochondrial structure in the tongues of Fischer 344 rats, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*, **10**, 357-362, doi: 10.21053/ceo.2016.01095.
23. Gounder, S. S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C. J., Whitehead, K. J., et al. (2012) Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training, *PLoS One*, **7**, e45697, doi: 10.1371/journal.pone.0045697.
24. Ungvari, Z., Tarantini, S., Kiss, T., Wren, J. D., Giles, C. B., et al. (2018) Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature, *Nat. Rev. Cardiol.*, **15**, 555-565, doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
25. Fulop, G. A., Kiss, T., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., et al. (2018) Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation, *GeroScience*, **40**, 513-521, doi: 10.1007/s11357-018-0047-6.
26. George, L., Lokhandwala, M. F., and Asghar, M. (2009) Exercise activates redox-sensitive transcription factors and restores renal D1 receptor function in old rats, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **297**, 1174-1180, doi: 10.1152/ajprenal.00397.2009.
27. Li, M., Liu, R. M., Timblin, C. R., Meyer, S. G., Mossman, B. T., et al. (2006) Age affects ERK1/2 and Nrf2 signaling in the regulation of GCLC expression, *J. Cell Physiol.*, **206**, 518-525.
28. Sachdeva, M. M., Cano, M., and Handa, J. T. (2014) Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult, *Exp. Eye Res.*, **119**, 111-114, doi: 10.1016/j.exer.2013.10.024.
29. Wu, D. M., Ji, X., Ivanchenko, M. V., Chung, M., Piper, M., et al. (2021) Nrf2 overexpression rescues the RPE in mouse models of retinitis pigmentosa, *JCI Insight*, **6**, e145029, doi: 10.1172/jci.insight.145029.
30. Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019) Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9372182, doi: 10.1155/2019/9372182.
31. Bose, C., Alves, I., Singh, P., Palade, P. T., Carvalho, E., et al. (2020) Sulforaphane prevents age-associated cardiac and muscular dysfunction through Nrf2 signaling, *Aging Cell*, **19**, e13261, doi: 10.1111/acer.13261.
32. Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., Ventura-Gallegos, J. L., Lazzarini, R., Galván-Arzate, S., et al. (2014) Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1901-1912, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143.
33. Miller, C. J., Gounder, S. S., Kannan, S., Goutam, K., Muthusamy, V. R., et al. (2012) Disruption of Nrf2/ARE signaling impairs antioxidant mechanisms and promotes cell degradation pathways in aged skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1038-1050, doi: 10.1016/j.bbdis.2012.02.007.
34. Kitaoka, Y., Tamura, Y., Takahashi, K., Takeda, K., Takemasa, T., et al. (2019) Effects of Nrf2 deficiency on mitochondrial oxidative stress in aged skeletal muscle, *Physiol. Rep.*, **7**, e13998, doi: 10.14814/phy2.13998.
35. Li, D., Zhao, H., Cui, Z. K., and Tian, G. (2021) The role of Nrf2 in hearing loss, *Front. Pharmacol.*, **12**, 620921, doi: 10.3389/fphar.2021.620921.
36. Hosokawa, K., Hosokawa, S., Ishiyama, G., Ishiyama, A., and Lopez, I. A. (2018) Immunohistochemical localization of Nrf2 in the human cochlea, *Brain Res.*, **1700**, 1-8, doi: 10.1016/j.brainres.2018.07.004.
37. Hoshino, T., Tabuchi, K., Nishimura, B., Tanaka, S., Nakayama, M., et al. (2011) Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **415**, 94-98, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.019.
38. Honkura, Y., Matsuo, H., Murakami, S., Sakiyama, M., Mizutani, K., et al. (2016) Nrf2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea, *Sci. Rep.*, **6**, 19329, doi: 10.1038/srep19329.
39. Valcarcel-Ares, M. N., Gautam, T., Warrington, J. P., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., et al. (2012) Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **67**, 821-829, doi: 10.1093/gerona/glr229.
40. Kapeta, S., Chondrogianni, N., and Gonos, E. S. (2010) Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **285**, 8171-8184, doi: 10.1074/jbc.M109.031575.
41. Jódar, L., Mercken, E. M., Ariza, J., Younts, C., González-Reyes, J. A., et al. (2011) Genetic deletion of Nrf2 promotes immortalization and decreases life span of murine embryonic fibroblasts, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 247-256, doi: 10.1093/gerona/glr181.
42. Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., et al. (2017) Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism, *Aging Cell*, **16**, 564-574, doi: 10.1111/acer.12587.
43. Lerner, C., Bitto, A., Pulliam, D., Nacarelli, T., Konigsberg, M., et al. (2013) Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts, *Aging Cell*, **12**, 966-977, doi: 10.1111/acer.12122.
44. Zhang, Y., Unnikrishnan, A., Deepa, S. S., Liu, Y., Li, Y., et al. (2017) A new role for oxidative stress in aging: The accelerated aging phenotype in Sod1^{-/-} mice is correlated to increased cellular senescence, *Redox Biol.*, **11**, 30-37, doi: 10.1016/j.redox.2016.10.014.
45. Corenblum, M. J., Ray, S., Remley, Q. W., Long, M., et al. (2016) Reduced Nrf2 expression mediates the decline in neural stem cell function during a critical middle-age period, *Aging Cell*, **15**, 725-736, doi: 10.1111/acer.12482.
46. Volonte, D., Liu, Z., Musille, P. M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., et al. (2013) Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1852-1862, doi: 10.1091/mbc.E12-09-0666.
47. Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T. C., Yang, J., et al. (2016) Repression of the antioxidant Nrf2 pathway in premature aging, *Cell*, **165**, 1361-1374, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.017.
48. Orr, W. C., Radyuk, S. N., Prabhudesai, L., Toroser, D., Benes, J. J., et al. (2005) Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 37331-37338, doi: 10.1074/jbc.M508272200.

49. Jasper, H. (2008) SKNy worms and long life, *Cell*, **132**, 915-916, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.002.
50. Bruns, D. R., Drake, J. C., Biela, L. M., Peelor, F. F. 3rd, Miller, B. F., et al. (2015) Nrf2 signaling and the slowed aging phenotype: evidence from long-lived models, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 732596, doi: 10.1155/2015/732596.
51. Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Buelna-Chontal, M., Garibay, C., Hernández-Reséndiz, S., et al. (2017) 3-NP-induced Huntington's-like disease impairs Nrf2 activation without loss of cardiac function in aged rats, *Exp. Gerontol.*, **96**, 89-98, doi: 10.1016/j.exger.2017.06.009.
52. Morin, P. Jr, Ni, Z., McMullen, D. C., and Storey, K. B. (2008) Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*, *Mol. Cell. Biochem.*, **312**, 121-129, doi: 10.1007/s11010-008-9727-3.
53. Levy, S., and Forman, H. J. (2010) C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements, *IUBMB Life*, **62**, 237-246, doi: 10.1002/iub.314.
54. Jain, A. K., and Jaiswal, A. K. (2007) GSK3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2, *J. Biol. Chem.*, **282**, 16502-16510, doi: 10.1074/jbc.M611336200.
55. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., et al. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation, *Nat. Genet.*, **35**, 238-245, doi: 10.1038/ng1248.
56. Sykiotis, G. P., and Bohmann, D. (2010) Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease, *Sci. Signal.*, **3**, re3, doi: 10.1126/scisignal.3112re3.
57. Castiglione, G. M., Xu, Z., Zhou, L., and Duh, E. J. (2020) Adaptation of the master antioxidant response connects metabolism, lifespan and feather development pathways in birds, *Nat. Commun.*, **11**, 2476, doi: 10.1038/s41467-020-16129-4.
58. Rahman, M. M., Sykiotis, G. P., Nishimura, M., Bodmer, R., and Bohmann, D. (2013) Declining signal dependence of Nrf2-MafS-regulated gene expression correlates with aging phenotypes, *Aging Cell*, **12**, 554-562, doi: 10.1111/ace.12078.
59. Kopacz, A., Klóska, D., Proniewski, B., Cysewski, D., Personnic, N., et al. (2020) Keap1 controls protein S-nitrosation and apoptosis-senescence switch in endothelial cells, *Redox Biol.*, **28**, 101304, doi: 10.1016/j.redox.2019.101304.
60. Kloska, D., Kopacz, A., Cysewski, D., Aepfelbacher, M., Dulak, J., et al. (2019) Nrf2 sequesters Keap1 preventing podosome disassembly: a quintessential duet moonlights in endothelium, *Antioxid. Redox Signal.*, **30**, 1709-1730, doi: 10.1089/ars.2018.7505.
61. Palsamy, P., Bidasee, K. R., Ayaki, M., Augusteyn, R. C., Chan, J. Y., et al. (2014) Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts, *Free Radic. Biol. Med.*, **72**, 134-148, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.010.
62. Cloer, E. W., Goldfarb, D., Schrank, T. P., Weissman, B. E., and Major, M. B. (2019) NRF2 activation in cancer: from DNA to protein, *Cancer Res.*, **79**, 889-898, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2723.
63. Dhakshinamoorthy, S., Jain, A. K., Bloom, D. A., and Jaiswal, A. K. (2005) Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16891-16900, doi: 10.1074/jbc.M500166200.
64. Tian, X., Cong, F., Guo, H., Fan, J., Chao, G., and Song, T. (2019) Downregulation of Bach1 protects osteoblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative damage *in vitro* by enhancing the activation of Nrf2/ARE signaling, *Chem. Biol. Interact.*, **309**, 108706, doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.019.
65. Yamaoka, M., Shimizu, H., Takahashi, T., Omori, E., and Morimatsu, H. (2017) Dynamic changes in Bach1 expression in the kidney of rhabdomyolysis-associated acute kidney injury, *PLoS One*, **12**, e0180934, doi: 10.1371/journal.pone.0180934.
66. Meng, D., Wang, X., Chang, Q., Hitron, A., Zhang, Z., et al. (2010) Arsenic promotes angiogenesis *in vitro* via a heme oxygenase-1-dependent mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **244**, 291-299, doi: 10.1016/j.taap.2010.01.004.
67. Zhang, H., Liu, H., Davies, K. J., Sioutas, C., Finch, C. E., et al. (2012) Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 2038-2046, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.042.
68. Shenvi, S. V., Smith, E., and Hagen, T. M. (2012) Identification of age-specific Nrf2 binding to a novel antioxidant response element locus in the Gclc promoter: a compensatory means for the loss of glutathione synthetic capacity in the aging rat liver? *Aging Cell*, **11**, 297-304, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00788.x.
69. Jiang, T., Harder, B., Rojo de la Vega, M., Wong, P. K., Chapman, E., et al. (2015) p62 links autophagy and Nrf2 signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **88** (Pt B), 199-204, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014.
70. Kwon, J., Han, E., Bui, C. B., Shin, W., Lee, J., et al. (2012) Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62-Keap1-Nrf2-Nqo1 cascade, *EMBO Rep.*, **13**, 150-156, doi: 10.1038/embor.2011.246.
71. Bitto, A., Lerner, C. A., Nacarelli, T., Crowe, E., Torres, C., et al. (2014) P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease, *Age (Dordr.)*, **36**, 9626, doi: 10.1007/s11357-014-9626-3.
72. Iwahana, E., Hamada, T., Uchida, A., and Shibata, S. (2007) Differential effect of lithium on the circadian oscillator in young and old hamsters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 752-756, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.042.
73. Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., et al. (2017) *In vivo* regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains, *Sci. Rep.*, **7**, 8602, doi: 10.1038/s41598-017-09239-5.
74. Zmijewski, J. W., and Jope, R. S. (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts, *Aging Cell*, **3**, 309-317, doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00117.x.
75. Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., et al. (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2719-2723, doi: 10.1073/pnas.93.7.2719.
76. Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., and Arias, C. (2011) GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration, *Int. J. Alzheimer's Dis.*, **11**, 1-12, doi: 10.4061/2011/189728.
77. Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005) A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian

- circadian clock, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29397-29402, doi: 10.1074/jbc.M503526200.
78. Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., et al. (2018) Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 8460-8468, doi: 10.1073/pnas.1800431115.
 79. Hiebert, P., Wietecha, M. S., Cangkrama, M., Haertel, E., Mavrogonatou, E., et al. (2018) Nrf2-mediated fibroblast reprogramming drives cellular senescence by targeting the matrisome, *Dev. Cell*, **46**, 145-161.e10, doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.012.
 80. Yuan, H., Xu, Y., Luo, Y., Wang, N. X., and Xiao, J. H. (2021) Role of Nrf2 in cell senescence regulation, *Mol. Cell. Biochem.*, **476**, 247-259, doi: 10.1007/s11010-020-03901-9.
 81. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 89-116, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
 82. Shanmugam, G., Narasimhan, M., Conley, R. L., Sairam, T., Kumar, A., et al. (2017) Chronic endurance exercise impairs cardiac structure and function in middle-aged mice with impaired Nrf2 signaling, *Front. Physiol.*, **8**, 268, doi: 10.3389/fphys.2017.00268.
 83. Ahn, B., Pharaoh, G., Premkumar, P., Huseman, K., Ranjit, R., et al. (2018) Nrf2 deficiency exacerbates age-related contractile dysfunction and loss of skeletal muscle mass, *Redox Biol.*, **17**, 47-58, doi: 10.1016/j.redox.2018.04.004.
 84. Nakagami, Y. (2016) Nrf2 is an attractive therapeutic target for retinal diseases, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 7469326, doi: 10.1155/2016/7469326.
 85. Vnukov, V. V., Gutsenko, O. I., Milutina, N. P., Kornienko, I. V., Ananyan, A. A., et al. (2015) Influence of SkQ1 on expression of Nrf2 gene, are-controlled genes of antioxidant enzymes and their activity in rat blood leukocytes under oxidative stress, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1598-1605, doi: 10.1134/S0006297915120081.
 86. Vnukov, V. V., Gutsenko, O. I., Milutina, N. P., Kornienko, I. V., Ananyan, A. A., et al. (2017) SkQ1 regulates expression of Nrf2, ARE-controlled genes encoding antioxidant enzymes, and their activity in cerebral cortex under oxidative stress, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 942-952, doi: 10.1134/S0006297917080090.
 87. Cuadrado, A., Manda, G., Hassan, A., Alcaraz, M. J., Barbas, C., et al. (2018) Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach, *Pharmacol. Rev.*, **70**, 348-383, doi: 10.1124/pr.117.014753.
 88. Brandes, M. S., and Gray, N. E. (2020) NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases, *ASN Neuro*, **12**, 1759091419899782, doi: 10.1177/1759091419899782.
 89. Cui, L., Zhou, Q., Zheng, X., Sun, B., and Zhao, S. (2020) Mitoquinone attenuates vascular calcification by suppressing oxidative stress and reducing apoptosis of vascular smooth muscle cells via the Keap1/Nrf2 pathway, *Free Radic. Biol. Med.*, **161**, 23-31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.028.
 90. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/S0006297920070111.
 91. Hushpulian, D. M., Ammal Kaidery, N., Ahuja, M., Poloznikov, A. A., Sharma, S. M., et al. (2021) Challenges and limitations of targeting the Keap1-Nrf2 pathway for neurotherapeutics: Bach1 de-repression to the rescue, *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 673205, doi: 10.3389/fnagi.2021.673205.
 92. Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2021) Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation, *Life Sci.*, **291**, 120111, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120111.
 93. Farré, X., Molina, R., Barteri, F., Timmers, P. R. H. J., Joshi, P. K., et al. (2021) Comparative analysis of mammal genomes unveils key genomic variability for human life span, *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 4948-4961, doi: 10.1093/molbev/msab219.
 94. Holtze, S., Gorshkova, E., Braude, S., Cellerino, A., Dammann, P., et al. (2021) Alternative animal models of aging research, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 660959, doi: 10.3389/fmolb.2021.660959.
 95. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., et al. (2021) Comprehensive analysis of 13C6 Glucose fate in the hypoxiatolerant blind mole rat skin fibroblasts, *Metabolites*, **11**, 734, doi: 10.3390/metabo11110734.
 96. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., et al. (2021) Glutamine homeostasis and its role in the adaptive strategies of the blind mole rat, *Spalax*, *Metabolites*, **11**, 755, doi: 10.3390/metabo11110755.
 97. Omotoso, O., Gladyshev, V. N., and Zhou, X. (2021) Lifespan extension in long-lived vertebrates rooted in ecological adaptation, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 704966, doi: 10.3389/fcell.2021.704966.
 98. Podder, A., Raju, A., and Schork, N. J. (2021) Cross-species and human inter-tissue network analysis of genes implicated in longevity and aging reveal strong support for nutrient sensing, *Front. Genet.*, **12**, 719713, doi: 10.3389/fgene.2021.719713.
 99. Dontsov, A. E., Sakina, N. L., Yakovleva, M. A., Bastrakov, A. I., Bastrakova, I. G., et al. (2020) Ommochromes from the compound eyes of insects: Physicochemical properties and antioxidant activity, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 668-678, doi: 10.1134/S0006297920060048.
 100. Omran, B., and Baek, K. H. (2021) Nanoantioxidants: pioneer types, advantages, limitations, and future insights, *Molecules*, **26**, 7031, doi: 10.3390/molecules26227031.
 101. Ushakova, N. A., Brodsky, E. S., Tikhonova, O. V., Dontsov, A. E., Marsova, M. V., et al. (2021) Novel extract from beetle *Ulomoides dermestoides*: a study of composition and antioxidant activity, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1055, doi: 10.3390/antiox10071055.
 102. Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., Cuadrado, P., et al. (2015) Melatonin-sulforaphane hybrid ITH12674 induces neuroprotection in oxidative stress conditions by a "drug-prodrug" mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1807-1821, doi: 10.1111/bph.13025.
 103. Gameiro, I., Michalska, P., Tenti, G., Cores, Á., Buendia, I., et al. (2017) Discovery of the first dual GSK3 β inhibitor/Nrf2 inducer. A new multitarget therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Sci. Rep.*, **7**, 45701, doi: 10.1038/srep45701.
 104. Demuro, S., Di Martino, R. M. C., Ortega, J. A., and Cavalli, A. (2021) GSK-3 β , FYN, and DYRK1A: Master regulators in neurodegenerative pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9098, doi: 10.3390/ijms22169098.

LABILITY OF THE Nrf2/Keap/ARE CELL PROTECTIVE SYSTEM IN DIFFERENT MODELS OF CELL AGING AND AGE-RELATED PATHOLOGIES

Review

G. A. Shilovsky^{1,2,3}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

³ Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia

It is known that the level of oxidative stress in the organism increases with age. Accumulation of damage leading to disruption of the genome integrity can be the cause of the development of many age-related diseases and the appearance of phenotypic and physiological signs of aging. In this regard, the Nrf2 system, which regulates the expression of numerous enzymes responsible for antioxidant protection and detoxification, is of great interest. The review summarizes and analyzes data on changes in the Nrf2 system during aging *in vivo* and *in vitro* in various organs and tissues. Analysis of the literature suggests that the ability of Nrf2 to activate (triggered by an increased level of oxidative stress) steadily decreases with age. At the same time, the dynamics of Nrf2 activity measured under stress-free conditions does not have such a clear direction: in many studies, the above differences are statistically insignificant, although it is known for sure that the level of oxidative stress steadily increases with aging. This review examines the role of regulatory systems existing in the cell that limit the ability of Nrf2 to respond to oxidative stress. Senescent cells are vulnerable to oxidative damage due to impaired Nrf2 signaling, and activation of the Nrf2 pathway is a promising target for new pharmacological or genetic therapeutic strategies. Suppressors of Nrf2 expression, such as Keap1, Gsk3, c-Myc and Bach1, may contribute to age-related impairment of the inducibility of Nrf2-regulated antioxidant genes. Understanding the mechanisms of interaction of regulatory cascades linking programs for maintaining homeostasis and the cell's response to oxidative stress contributes to the elucidation of the molecular mechanisms underlying aging and longevity.

Keywords: Nrf2, Keap1, aging, lifespan, oxidative stress, age-related disorders, antioxidants

УДК 577.218

ЛИЗИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ГИСТОНОВАЯ ДЕМЕТИЛАЗА 1 СПОСОБСТВУЕТ ОНКОГЕНЕЗУ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПИЩЕВОДА ПУТЕМ АКТИВАЦИИ DUSP4

© 2022 J. Han^{1,2#}, S. Ye^{3#}, J. Chen^{1,2}, K. Wang^{1,2}, J. Jin^{1,2}, Z. Zeng^{3*}, S. Xue^{1,2*}

¹ Department of Immunization, Fujian Academy of Medical Sciences,
350003 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: fjykyxsj@126.com

² Fujian Institute of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, 350003 Fuzhou, Fujian, China

³ Department of Cardiothoracic Surgery, 900 Hospital of the Joint Logistics Team,
350025 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: 13809542597@139.com

Поступила в редакцию 06.05.2021

После доработки 20.10.2021

Принята к публикации 21.11.2021

Плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) преобладает среди существующих подтипов рака пищевода (РП) и имеет неблагоприятный прогноз из-за агрессивного характера протекания болезни. Поэтому поиск новых прогностических биомаркеров и терапевтических мишеней при ПРП является актуальной задачей. Лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1 (LSD1) играет ключевую роль в регуляции онкогенеза ПРП. Тем не менее на текущий момент подробный механизм регулируемого LSD1 развития ПРП не установлен. Настоящее исследование направлено на изучение молекулярного механизма, лежащего в основе онкогенеза ПРП, регулируемого LSD1. Путем секвенирования транскриптома на фоне сайленсинга гена *LSD1* мы обнаружили дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) в линии клеток ПРП человека TE-1. Далее мы исследовали паттерны экспрессии выбранных молекул в тканях и клеточных линиях ПРП с помощью RT-qPCR и вестерн-блоттинга. Кроме того, мы исследовали роль выбранных молекул в развитии ПРП с помощью сайленсинга и анализа сверхэкспрессии генов. Секвенирование транскриптома показало, что экспрессия фосфатазы 4 с двойной специфичностью (DUSP4) в TE-1 была значительно снижена после подавления экспрессии LSD1. Кроме того, уровень экспрессии мРНК DUSP4 был значительно выше в тканях ПРП, в особенности полученных от пациентов с инвазией или метастазами. Более того, экспрессия DUSP4 положительно коррелировала с экспрессией LSD1 в тканях ПРП. Сверхэкспрессия DUSP4 способствовала пролиферации, инвазии и миграции клеток ПРП, тогда как сайленсинг гена *DUSP4* имел противоположный эффект. Сверхэкспрессия DUSP4 также способствовала онкогенности клеток ПРП *in vivo*, в то время как подавление экспрессии DUSP4 ингибировало рост опухоли. Важно отметить, что подавление пролиферации, инвазии и миграции клеток ингибитором LSD1 (ZY0511) обращалось при сверхэкспрессии DUSP4. Таким образом, мы обнаружили, что LSD1 способствует онкогенезу ПРП, активируя DUSP4, которая является потенциальной терапевтической и диагностической мишенью при ПРП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фосфатаза 4 с двойной специфичностью, плоскоклеточный рак пищевода, лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1.

DOI: 10.31857/S0320972522010079

ВВЕДЕНИЕ

Рак пищевода (РП) занимает 8-е место среди наиболее распространенных злокачественных новообразований и является одним из основных видов опухолей желудочно-кишечного тракта. Данный вид рака характеризуется в основном

высокой инвазивностью и плохим клиническим прогнозом, что представляет серьезную угрозу для здоровья людей [1, 2]. Плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) является основным подтипом РП. Из-за его злокачественности, в частности высокой инвазивности и уровня метастазирования в лимфатические узлы, протекание ПРП зачастую приводит к плохому клиническому исходу [3]. Следовательно, основным направлением онкологических исследований у пациентов с ПРП является повышение терапевтической эффективности и улучшение прогноза болезни.

Лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1 (LSD1) представляет собой ядерную гистоновую деметилазу, которая является членом семейства аминоксидаз (АО). LSD1 — флавин-

Принятые сокращения: ССК-8 — набор для подсчета клеток 8; ДЭГ — дифференциально экспрессируемые гены; DUSP4 — фосфатаза 4 с двойной специфичностью; РП — рак пищевода; ПРП — плоскоклеточный рак пищевода; H3K4me2 — гистон H3 с диметилированным лизин-ом в четвертом положении; LSD1 — лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

содержащая АО, которая катализирует деметилирование гистона H3 по лизину в 4-м положении посредством ФАД-зависимого окисления. LSD1 участвует в эмбриональной дифференцировке, пролиферации плюрипотентных стволовых клеток и развитии ВИЧ-инфекции [4–6]. Известно, что экспрессия LSD1 повышается в различных раковых тканях и вносит большой вклад в онкогенез множества опухолей [7–10]. Более того, экспрессия LSD1 при ПРП и ее влияние на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток ПРП описаны во многих исследованиях. Yu et al. выявили, что экспрессия LSD1 повышалась в тканях ПРП, что, в свою очередь, ассоциировалось с метастазированием в лимфатические узлы и плохой выживаемостью [11]. Исследование *in vitro* также показало, что регуляция экспрессии LSD1 в инвазивных клеточных линиях ПРП нарушена, а подавление экспрессии и фармакологическое ингибирование LSD1 ассоциированы со снижением миграции и инвазии клеток ПРП [11]. Проведенные ранее исследования также подтвердили подавляющее действие ингибитора LSD1 на рост клеток, а также индуцирование им апоптоза в клетках ПРП [12, 13]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях [14, 15]. Если объединить все полученные результаты, становится очевидно, что действие LSD1 имеет важное значение в диагностике и лечении ПРП. Hou et al. показали, что LSD1 положительно регулирует передачу сигналов в путях Notch и PI3K/Akt/mTOR за счет связывания с промоторными областями соответствующих генов пути Notch в клетках ПРП [16]. Однако в вышеупомянутом исследовании не обсуждалась подробно роль сигнальных путей, регулируемых LSD1, при онкогенезе ПРП. Следовательно, детальный механизм регулируемого LSD1 развития ПРП остается неясным.

В настоящем исследовании путем сайленсинга *LSD1* в клеточной линии ПРП TE-1 мы обнаружили при помощи секвенирования транскриптома, что уровень экспрессии фосфатазы 4 двойной специфичности (DUSP4) был значительно снижен. Кроме того, была подтверждена сверхэкспрессия DUSP4 в опухолевых тканях и ее влияние на пролиферацию, функцию и онкогенность клеток ПРП. Также была подтверждена способность DUSP4 компенсировать ингибирование LSD1. Таким образом, наше исследование предоставляет первые доказательства, демонстрирующие, что LSD1 способствует развитию ПРП, вероятно, посредством нижестоящих сигналов, что улучшает наше понимание процесса LSD1-регулируемого развития ПРП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и культуры. Линия нормальных эпителиальных клеток пищевода человека Het-1A и линии ПРП, TE-1, TE-13 и KYSE-450, были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, American Type Culture Collection). Het-1A инкубировали в бессывороточной среде для кератиноцитов (Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM), «Invitrogen», США). TE-1, TE-13 и KYSE-450 инкубировали в среде RPMI-1640 («Invitrogen») с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Invitrogen»). Все клетки культивировали в увлажненной атмосфере при 37 °C с 5%-ным CO₂. Для обработки клеток TE-1 был использован новый ингибитор LSD1, ZY0511 (предоставленный Государственной лабораторией биотерапии, Сычуаньский университет, Сычуань, Китай), в концентрации 2 мкМ [17, 18].

Клинические образцы тканей. В общей сложности 43 пары образцов ПРП и прилегающих доброкачественных тканей были получены путем хирургической резекции в больнице провинции Фуцзянь (Фучжоу, Фуцзянь, Китай) с письменного информированного согласия пациентов, среди которых было 28 мужчин и 15 женщин. До операции пациенты не получали ни химиотерапию, ни лучевую терапию. Все образцы тканей были гистопатологически исследованы тремя независимыми патологами. Образцы свежих тканей замораживали в жидком азоте и до использования хранили при температуре –80 °C. Все пациенты дали согласие на данное исследование в соответствии с установленными больницей этическими нормами. Данное исследование было рассмотрено и одобрено Экспертным советом больницы провинции Фуцзянь [No. (DL) 2019-01]. Все клинические исследования проводились в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации.

Трансфекция миРНК. Контрольные малые интерферирующие РНК (миРНК, siRNA) и миРНК к LSD1 и к DUSP4 человека были приобретены в компании «Invitrogen». Целевые последовательности были следующими:

Контроль, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',
LSD1, 5'-CCGGAUGACUUCUCAAGAATT-3';

Контроль, 5'-CCCATCCTTCAACGAGCAT-3',
DUSP4, 5'-CCCAGTACCTTACCAGCAT-3'.

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах, а затем трансфицировали миРНК (100 пмоль/лунку) с использованием реагента RNAiMAX

(«Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Через 48 ч проводили определения уровней эндогенного LSD1 или DUSP4 с помощью qRT-PCR.

Конструирование и трансфекция векторов. Экспрессионный вектор DUSP4 (pCMV-мус-DUSP4) был получен в лаборатории «BioVector Science» (Пекин, Китай). Вектор стабильно экспрессировался в клетках TE-1. В качестве отрицательного контроля использовали pCMV-мус-control. Трансфекцию выполняли с помощью липофектамина 3000 («Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Экспрессию DUSP4 оценивали с помощью qRT-PCR.

Секвенирование РНК. Тотальную РНК получали из приблизительно 5 млн клеток TE-1 с сайленсингом *LSD1* и из контрольных клеток с использованием тризола («Ambion», США) в соответствии с инструкциями производителя. Затем тотальную РНК (2 мкг) использовали для приготовления библиотеки RNA-seq с использованием набора «NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit» («Illumina», США) в соответствии с протоколом производителя. Образцы из библиотеки секвенировали на платформе Illumina HiSeq 4000 с длиной парноконцевых прочтений 150 нуклеотидов (2 × 150). «Сырые данные» в формате FASTQ обрабатывали с помощью собственных скриптов на Perl. Прочтения выравнивали на геном человека (сборка GRCh38) с использованием TopHat 2 (версия 2.1.0). Уровни экспрессии генов (FPKM, количество фрагментов на килобазу транскрипта на миллион картированных прочтений) рассчитывали с помощью HTSeq (версия 0.5.4 r3). Все последующие статистические анализы, включая PCA (анализ главных компонентов), были выполнены с помощью программного пакета edgeR.

Вестерн-блоттинг. Цельноклеточные лизаты клеток, обработанные как указано выше, были отобраны из 6-луночных планшето. Лизаты разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата (SDS-PAAG), затем переносили на мембраны из поливинилиденфторида, которые инкубировали с антителами к LSD1 (# 2139), DUSP4 (# 5149), диметилированного по лизину 4 гистона H3 (H3K4me2, # 9725) и GAPDH (# 5174) («Cell Signaling Technology», США). Вторичные антитела, связанные с пероксидазой хрена (# 3999), использовали для визуализации иммунореактивности с использованием системы хемилюминесценции Amersham Image 600 («General Electric», США).

Количественный анализ методом ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Тотальную РНК экстрагировали и очищали с использованием

тризола. Синтез кДНК и qRT-PCR были проведены по ранее описанному протоколу [19]. Последовательности праймеров для qRT-PCR были следующими:

LSD1, 5'-CCAGAGATATTACTGCCGAGTT-3' (смысловый праймер) и 5'-GCTTTCCTTGTGTTTCAGCTAA-3' (антисмысловый праймер);

DUSP4, 5'-CTACATCCTAGGTTTCGGTCAAC-3' (смысловый праймер) и 5'-TAGACGATGACCGCCGAGTA-3' (антисмысловый праймер);

β-актин, 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' (смысловый праймер) и 5'-TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3' (антисмысловый праймер).

Относительную экспрессию рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

qRT-PCR выполняли с использованием набора «SYBR Premix Ex Taq™» («Takara», Япония) и системы ПЦР ABI7500 («Applied Biosystems», США).

Измерение жизнеспособности клеток. Для оценки пролиферации клеток использовали набор для подсчета клеток 8 (ССК-8). Для этого обработанные указанным выше образом клетки помещали в 96-луночные планшеты (2000 клеток/луночку). По истечении указанного времени обработанные клетки инкубировали с 10 мкл реагента ССК-8 («Dojindo», Япония). После 2-часовой инкубации измеряли оптическую плотность с помощью ридера Varioskan Flash («Thermo Fisher Scientific») при длине волны 450 нм (OD450).

Анализ способности клеток к инвазии. Способность клеток TE-1 к инвазии оценивали с помощью миграционного анализа в Transwell-системе. Для этого клетки, суспендированные в бессывороточной питательной среде DMEM с добавлением 1 мг/мл митомицина C (ингибитора пролиферации клеток) и ZY0511 (добавленного в соответствии с планом эксперимента), высевали в верхнюю камеру Transwell-системы. В нижнюю камеру добавляли среду DMEM, содержащую 20% FBS. После 36-часовой инкубации клетки, мигрировавшие в нижнюю часть системы, фиксировали, затем окрашивали 1%-ным кристаллическим фиолетовым и фотографировали. Степень инвазии измеряли путем подсчета числа окрашенных клеток.

Анализ миграционной активности клеток. Способность клеток TE-1 к миграции измеряли с помощью скретч-теста. Для этого клетки высеивали в 12-луночные планшеты и культивировали до 75%-ного уровня конfluence. Затем создавали царапину на поверхности клеточного монослоя с помощью кончика 200-микро-

литровой пипетки. Для удаления плавающих клеток культуры промывали, а затем прикрепленные клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 1% FBS и ZY0511 (добавленные в соответствии с планом эксперимента). Миграцию клеток в область царапины определяли через 36 ч для каждой группы. Площадь царапины рассчитывали с помощью программы ImageJ.

Эксперименты с использованием животных.

Самцы бестимусной линии мышей BALB/c nude возрастом 4–5 недель (весом 20–22,5 г) были предоставлены Центром животных «Gem Pharmatech Co., Ltd.» (Нанкин, Китай). Клетки, трансфицированные DUSP4-миРНК, вектором DUSP4, и соответствующие контрольные клетки линии TE-1 инокулировали подкожно на вентральную сторону правого ребра; плотность инокуляции составляла 5×10^6 клеток на мышь (6 мышей на группу). Чтобы проследить рост опухоли, объем опухоли измеряли каждые три дня у всех мышей. Для определения объема опухоли самый маленький диаметр (A) и самый большой диаметр (B) измеряли штангенциркулем. Объем (V) рассчитывали по формуле $V = (A^2 \times B) / 2$. Через 30 дней всех мышей анестезировали изофлураном (2%, ингаляционная анестезия), а затем умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Все мыши считались мертвыми после остановки сердца и дыхания. Опухоли мышей были удалены и взвешены. Все протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по уходу за животными и их использованию Академии медицинских наук Фуцзянь. Мышей содержали в специальном помещении, свободном от патогенов (specific pathogen-free, SPF) и ограниченном барьером, при температуре 20–30 °C, влажностью 60–80%, кормили SPF-кормом для мышей, вода была доступна *ad libitum*.

Статистическая обработка полученных результатов. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6. Были выполнены следующие тесты: Т-критерий Вилкоксона, односторонний тест ANOVA или *t*-критерий Стьюдента (в соответствующих случаях). Тест Бонферрони применялся для апостериорного множественного сравнения. Для анализа корреляций применяли метод Пирсона и критерий хи-квадрат Пирсона. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

LSD1 способствует экспрессии DUSP4 в клетках ПРП. Для исследования механизмов LSD1-

регулируемого канцерогенеза при ПРП мы анализировали глобальную экспрессию в клетках TE-1 в условиях сайленсинга *LSD1*. Для анализа клеток TE-1, трансфицированных контрольной и миРНК-LSD1, использовали RNA-seq (рис. 1, *a*). Транскриптомный анализ выявил большое количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) (рис. 1, *a* и *b*). По сравнению с контролем в клетках TE-1, трансфицированных миРНК-LSD1, было обнаружено 439 генов с повышенной и 69 генов – с пониженной экспрессией (рис. 1, *b*).

Следует отметить, что мы обнаружили значительное снижение экспрессии DUSP4 в клетках с сайленсингом *LSD1* (рис. 1, *c* и табл. 1). Снижение экспрессии DUSP4 в клетках TE-1 с сайленсингом *LSD1* было подтверждено при помощи анализа вестерн-блот и qRT-PCR (рис. 1, *d*). Кроме того, в присутствии ингибитора LSD1, ZY0511, экспрессия LSD1 не изменилась, однако экспрессия DUSP4 значительно снизилась (рис. 1, *e*). Предыдущие исследования показали, что деметилирование H3K4me2 может быть использовано для определения активности LSD1 [20, 21]. Отмечено, что ZY0511 приводит к повышению уровня H3K4me2 (рис. 1, *e*), что указывает на надежность экспериментальной системы. В целом, данные результаты продемонстрировали ингибирующий эффект LSD1 на экспрессию DUSP4 в клетках ПРП.

Сверхэкспрессия DUSP4 в образцах ПРП.

Уровни DUSP4 в 43 парах тканей ПРП и соседних доброкачественных определяли с помощью qRT-PCR. На рис. 2, *a* продемонстрирована значительная сверхэкспрессия DUSP4 в образцах ткани ПРП по сравнению с расположенными рядом доброкачественными тканями. Анализ корреляции между уровнями DUSP4 и клинико-патологическими характеристиками пациентов с ПРП показал, что высокий уровень экспрессии DUSP4 положительно коррелировал с размером опухоли при ПРП и патологической стадией T/N (табл. 2). Более того, 18 образцов ПРП с метастазами характеризовались более высокой экспрессией DUSP4, чем 25 нематастатических образцов ПРП (рис. 2, *b*). Кроме того, по сравнению с 21 образцом ПРП диаметром менее 3 см, 22 образца ПРП диаметром более 3 см характеризовались более высокой экспрессией DUSP4 (рис. 2, *c*). Важно отметить, что корреляционный анализ между уровнями DUSP4 и LSD1 в тканях ПРП показал, что уровни экспрессии DUSP4 были положительно ассоциированы с уровнем экспрессии LSD1 в тканях ПРП ($r = 0,8996$, $p < 0,0001$) (рис. 2, *d*), что свидетельствует о положительном эффекте LSD1 на

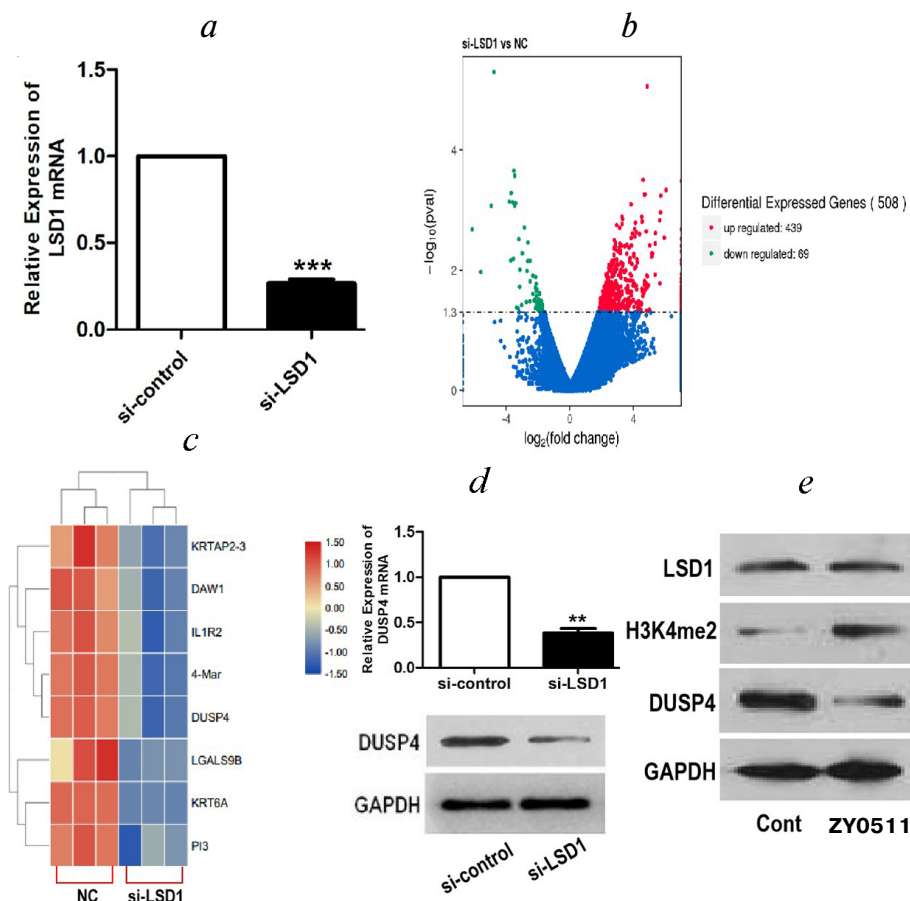


Рис. 1. LSD1 способствует экспрессии DUSP4 в клетках ПП. *a* – Уровни мРНК LSD1 в клетках TE-1, трансфицированных указанными миРНК, через 48 часов после трансфекции. *b* – Диаграмма Volcano, представляющая анализ дифференциальной экспрессии 508 генов, основанный на результатах секвенирования РНК клеток TE-1, трансфицированных миРНК-контролем и миРНК-LSD1 ($n = 3$ в каждой группе). По оси X показано изменение в логарифмическом масштабе ($\log_2$), по оси Y – отрицательный логарифм значения p ($\log_{10}$). Каждый ген представлен одной точкой на графике; красные точки – повышенная экспрессия (439 генов), зеленые – пониженная (69 генов). *c* – Тепловая карта, представляющая анализ дифференциальной экспрессии нескольких репрезентативных генов между клетками TE-1, трансфицированными миРНК-контролем и миРНК-LSD1 ($n = 3$ в каждой группе). *d* – Уровни мРНК или белка DUSP4 в клетках TE-1, трансфицированных миРНК-контролем и миРНК-LSD1. *e* – После обработки 2 мкМ ZY0511 или без нее через 48 ч оценивали уровни белка LSD1, H3K4me2 и DUSP4 с помощью вестерн-блоттинга. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего трех независимых экспериментов. *** $p < 0,001$ по t -критерию Стьюдента. Примечание: NC – клетки, трансфицированные миРНК-контролем (si-control); Cont – контрольная группа, ZY0511 – в присутствии ингибитора LSD1

экспрессию DUSP4 *in vivo*. Кроме того, были определены уровни экспрессии мРНК DUSP4 и белков LSD1, DUSP4 и H3K4me2 в нормальной эпителиальной линии клеток пищевода Het-1A и клеточных линиях ПП: TE-1, TE-13 и KYSE-450. Как показано на рис. 2, *e–i*, LSD1 и DUSP4 были значительно сверхэкспрессированы в клеточных линиях ПП. Тем не менее изменение уровня экспрессии H3K4me2 было противоположным таковому для LSD1 (рис. 2, *f–i*), что указывает на деметилирование H3K4me2 в клеточных линиях ПП, что подтверждает функцию LSD1. Примечательно, что уровни DUSP4 были самыми высокими в линии

агрессивных раковых клеток KYSE-450 (рис. 2, *f–i*), что доказывает вклад DUSP4 в злокачественность ПП.

Сверхэкспрессия DUSP4 способствует пролиферации, инвазии и миграции клеток ПП, тогда как нокдаун DUSP4 имеет противоположный эффект. Чтобы исследовать роль DUSP4 в онкогенезе ПП, мы активировали или ингибировали экспрессию DUSP4 путем трансфекции клеток TE-1 вектором, кодирующим DUSP4 (DUSP4-вектор) или миРНК-DUSP4 соответственно (рис. 3, *a*). Анализ ССК-8 показал, что сверхэкспрессия DUSP4 усиливала пролиферацию клеток TE-1 (рис. 3, *b*). Кроме того, результаты ана-

Таблица 1. Репрезентативные ДЭГ при анализе транскриптома (число прочтений)

Группа	si-Cont-1	si-Cont-2	si-Cont-3	si-LSD1-1	si-LSD1-2	si-LSD1-3	log ₂ (FC)	Значение <i>p</i>
Гены со сниженной экспрессией								
<i>DUSP4</i>	3360	2597	2840	232	307	585	−3,407	0,000771
<i>KRTAP2-3</i>	118	69	57	4	8	12	−3,8013	0,000728
<i>DAW1</i>	252	151	250	11	21	38	−3,6926	0,000521
<i>IL1R2</i>	302	196	232	12	24	50	−3,595	0,000744
<i>MARCHF4</i>	648	522	524	36	54	125	−3,4751	0,000845
<i>KRT6A</i>	1911	1707	1824	84	80	72	−4,7817	5,10E-06
<i>PI3</i>	988	710	658	109	82	31	−3,5168	0,000222
Гены с повышенной экспрессией								
<i>AGXT</i>	1	3	7	120	51	50	4,2234	0,020883
<i>VTGN1</i>	4	6	10	116	394	274	4,8795	8,79E-06
<i>TRANK1</i>	2	10	17	42	119	214	3,1454	0,001990
<i>FOXN1</i>	1	2	1	32	37	19	4,2008	0,002346
<i>ZCCHC12</i>	6	22	19	191	271	105	3,3335	0,001416

Примечание. log₂ (FC, Fold Change) — изменение в логарифмическом масштабе по основанию 2; si-Cont — клетки, трансфицированные миРНК-контролем; si-LSD1 — клетки, трансфицированные миРНК-LSD1.

лиза миграции в Transwell-системе показали, что сверхэкспрессия DUSP4 увеличивает количество инвазивных клеток. Скретч-тест показал, что сверхэкспрессия DUSP4 приводит к увеличению числа мигрирующих клеток (рис. 3, *c–f*). Нокдаун DUSP4 дает противоположные результаты (рис. 3, *b–f*). В целом, DUSP4 играет значительную роль в усилении пролиферации, инвазии и миграции клеток ПРП. Также мы проводили сайленсинг *DUSP4* в клеточной линии ПРП KYSE-450 посредством трансфекции миРНК (рис. S1, *a* в Приложении). Как показано на рис. S1, *b–f* в Приложении, клетки KYSE-450 с сайленсингом DUSP4 демонстрируют более низкий уровень пролиферации, инвазии и миграции, что дополнительно подтверждает результаты, представленные выше.

Сверхэкспрессия DUSP4 способствует онкогенности клеток ПРП, в то время как сайленсинг DUSP4 имеет обратный эффект. Влияние DUSP4 на онкогенность клеток ПРП также исследовали *in vivo*. Как показано на рис. 4, *a* и *b*, активацию или ингибирование экспрессии DUSP4 оценивали путем определения уровней мРНК или белка. Примечательно, что размеры и масса опухолей, сформированных DUSP4-сверхэкспрессирующими TE-1 клетками у мышей линии *nude*, были значительно больше, чем у мышей, инокулированных соответствующими контрольными TE-1 клетками (рис. 4, *c* и *e*). Кроме того, увеличение объема опухоли у мышей *nude*, инокулированных TE-1 со сверхэкспрессией

Таблица 2. Корреляция между DUSP4 и клинико-патологическими характеристиками у пациентов с ПРП

Характеристики	Число случаев	Число случаев с соответствующим уровнем DUSP4		Значение <i>p</i>
		низкий	высокий	
Всего	43	21	22	<i>p</i> = 0,2838
Пол				
Мужской	28	12	16	
Женский	15	9	6	<i>p</i> = 0,2797
Возраст				
≥65	20	8	12	
<65	23	13	10	<i>p</i> = 0,0223
Диаметр опухоли ПРП				
≥3,0 см	22	7	15	
<3,0 см	21	14	7	<i>p</i> = 0,0191
Патологическая стадия (Т)				
T2	25	16	9	
T3-T4	18	5	13	<i>p</i> = 0,0075
Патологическая стадия (N)				
N0	30	18	12	
N1-N3	13	3	10	

Примечание. В качестве порогового значения использовали средний уровень экспрессии DUSP4. Значение *p* определяли с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

DUSP4, было более значительным, чем у соответствующей контрольной группы, инокулированной TE-1 (рис. 4, *d*). Тем не менее клетки TE-1 с сайленсингом DUSP4 демонстрировали более слабую онкогенность по сравнению с соответствующими контрольными TE-1, основываясь из вышеупомянутых параметрах (рис. 4, *c–e*). Эти результаты позволяют предположить, что DUSP4 способствует онкогенезу клеток ПРП *in vivo*.

Сверхэкспрессия DUSP4 частично восстанавливает уровень пролиферации, инвазии и миграции, которые были снижены ингибитором LSD1 в

клетках ПРП. Может ли DUSP4 опосредовать онкогенез ПРП, регулируемый LSD1? При применении ZY0511 для ингибирования активности LSD1 было обнаружено, что пролиферация, инвазия и миграция клеток TE-1 значительно снижались, аналогично результатам нокдауна DUSP4 (рис. 5, *a–e*). Сверхэкспрессия DUSP4 в значительной степени обратила ингибирующее влияние ZY0511 на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток TE-1 (рис. 5, *a–e*). Полученные результаты позволяют предполагать, что DUSP4 является нижестоящим эффектором при онкогенезе ПРП, регулируемом LSD1 *in vitro*.

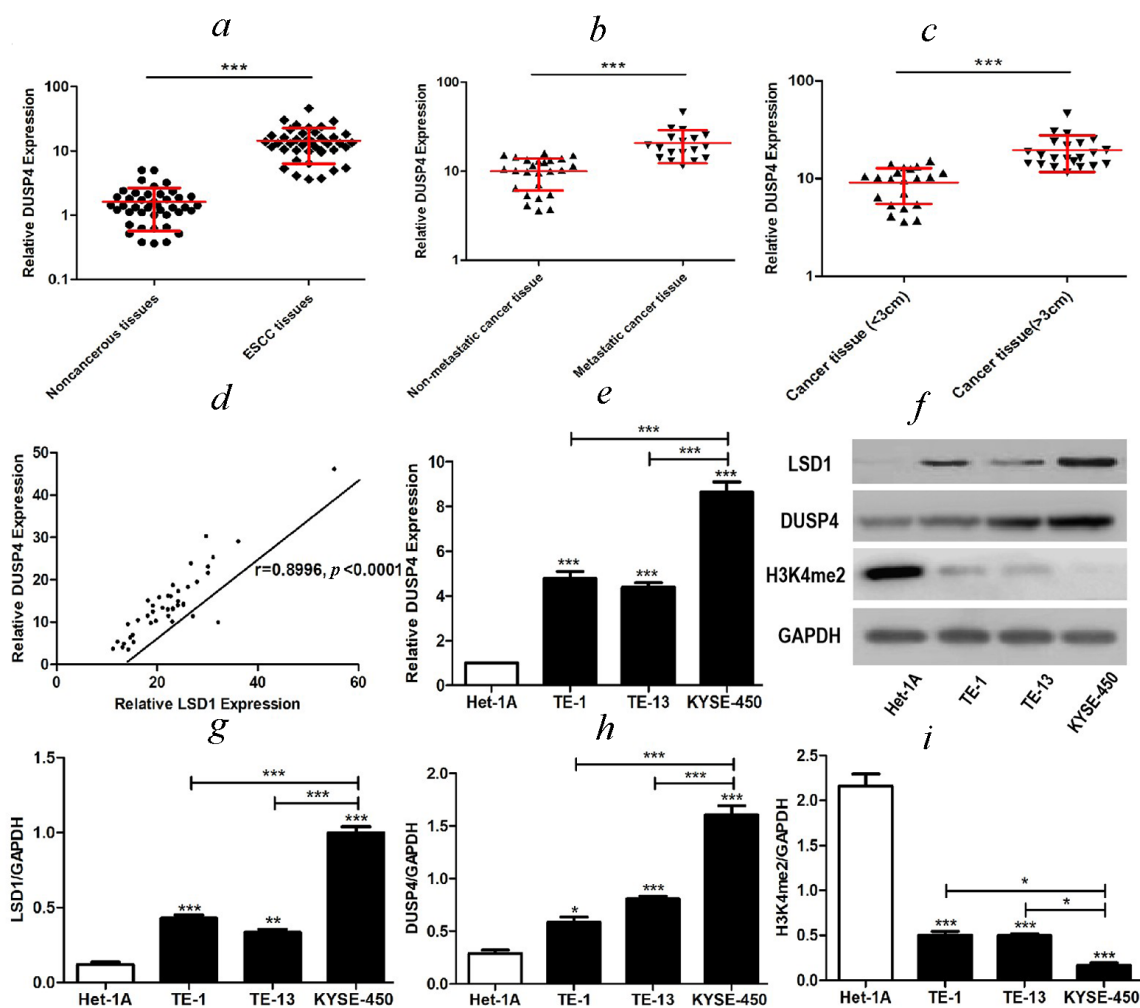


Рис. 2. Экспрессия DUSP4 в образцах ПРП (ESCC). *a* – Уровни мРНК DUSP4 в 43 парах тканей ПРП и прилегающих доброкачественных. *b* – Уровни мРНК DUSP4 в 18 образцах ПРП с метастазами и 25 неметастатических образцах ПРП. *c* – Уровни мРНК DUSP4 в 22 образцах ПРП диаметром более 3 см и 21 образце ПРП диаметром менее 3 см. Результаты *a–c* представлены в виде медианы с межквартильным размахом. *** $p < 0,001$ по критерию Вилкоксона. *d* – Ассоциация между уровнями мРНК LSD1 и DUSP4 в тканях ПРП (проанализировано с помощью корреляционного анализа Пирсона, $n = 43$, $r = 0,8996$, $p < 0,0001$). *e* – Уровни мРНК DUSP4 в нормальной линии эпителиальных клеток пищевода, Het-1A и клеточных линиях ПРП, TE-1, TE-13 и KYSE-450. *f–i* – Уровни белков LSD1, DUSP4 и H3K4me2 в Het-1A, TE-1, TE-13 и KYSE-450 оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Результаты *e–i* представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по однофакторному анализу ANOVA

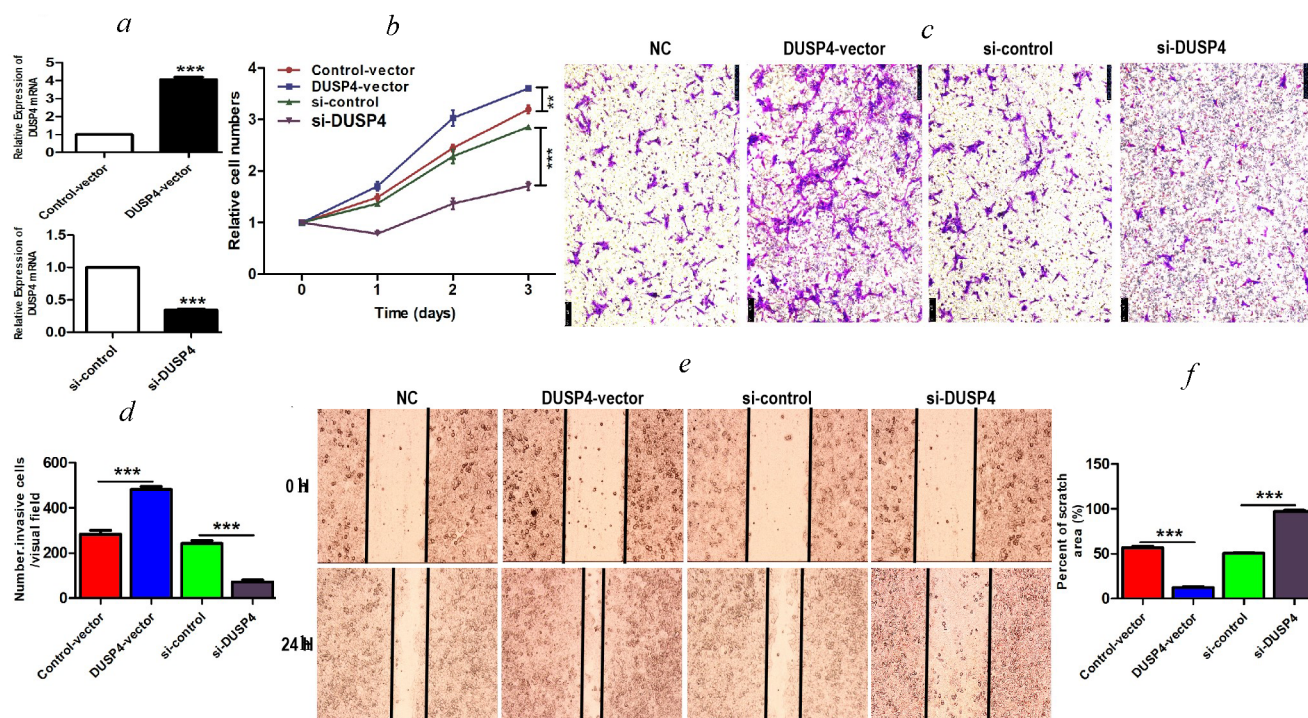


Рис. 3. Сверхэкспрессия DUSP4 способствует пролиферации, инвазии и миграции клеток ПРП, тогда как нокдаун DUSP4 имеет противоположный эффект. *a* – Уровни мРНК DUSP4 в клетках TE-1, трансфицированных указанными миРНК (si-) или плазмидами, через 48 ч. *b* – Пролиферация клеток TE-1, трансфицированных указанными миРНК или плазмидами, оцениваемая с помощью анализа ССК-8. *c, d* – Инвазия клеток TE-1, трансфицированных указанными миРНК или плазмидами, оцениваемая с помощью анализа миграции в Transwell-системе (масштаб 200 мкм). *e* – Миграция клеток TE-1, трансфицированных указанными миРНК или плазмидами, оцениваемая с помощью скретч-тестов. Изображения получали под микроскопом через 0 и 24 часа. *f* – Коэффициенты миграции клеток (24 ч / 0 ч) показаны на гистограмме. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по однофакторному анализу ANOVA. Примечание. NC – группа с контрольным вектором; DUSP4 – группа с DUSP4-вектором

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важность роли LSD1/KDM1A в онкогенезе привлекает большое внимание [7–10]. Примечательно, что все большее количество исследований, касающихся ПРП, также сосредоточивается на LSD1 [11–16]. Проведенные ранее исследования продемонстрировали критическую роль LSD1 в патогенезе ПРП [11–16], однако конкретный механизм LSD1-регуляции возникновения и развития ПРП не был установлен; исследование этого механизма составляет интересную научную проблему.

В условиях сайленсинга *LSD1* с помощью транскриптомного анализа мы обнаружили, что экспрессия *DUSP4* в клетках ПРП также была значительно ингибирована; данный факт подтверждает, что LSD1 положительно регулирует экспрессию *DUSP4* в клетках ПРП. Те же выводы были получены при анализе уровней мРНК и белка. *DUSP4* известен как биологический маркер множества злокачественных опухолей. Этот

белок является членом семейства фосфатаз с двойной специфичностью и может негативно регулировать активность MAP-киназ [22]. Изменения экспрессии *DUSP4* вовлечены в онкогенез множества опухолей. Уровень экспрессии *DUSP4* повышается при карциномах толстой кишки, молочной железы, прямой кишки, печени и поджелудочной железы, поэтому повышение экспрессии *DUSP4* может быть маркером неблагоприятного прогноза при различных злокачественных опухолях [23–26].

Zhang et al. показали, что сангвинарин подавляет рост и инвазию клеток рака желудка посредством ингибирования передачи сигналов *DUSP4* [27]. Xu et al. продемонстрировали, что miR-122-5p ингибирует миграцию и инвазию клеток рака желудка, воздействуя на *DUSP4* [28]. De et al. подтвердили, что высокая экспрессия *DUSP4* ассоциирована со сниженной общей выживаемостью и с клиническими характеристиками, типичными для высокоинвазивного колоректального рака (КРР) [29]. Бо-

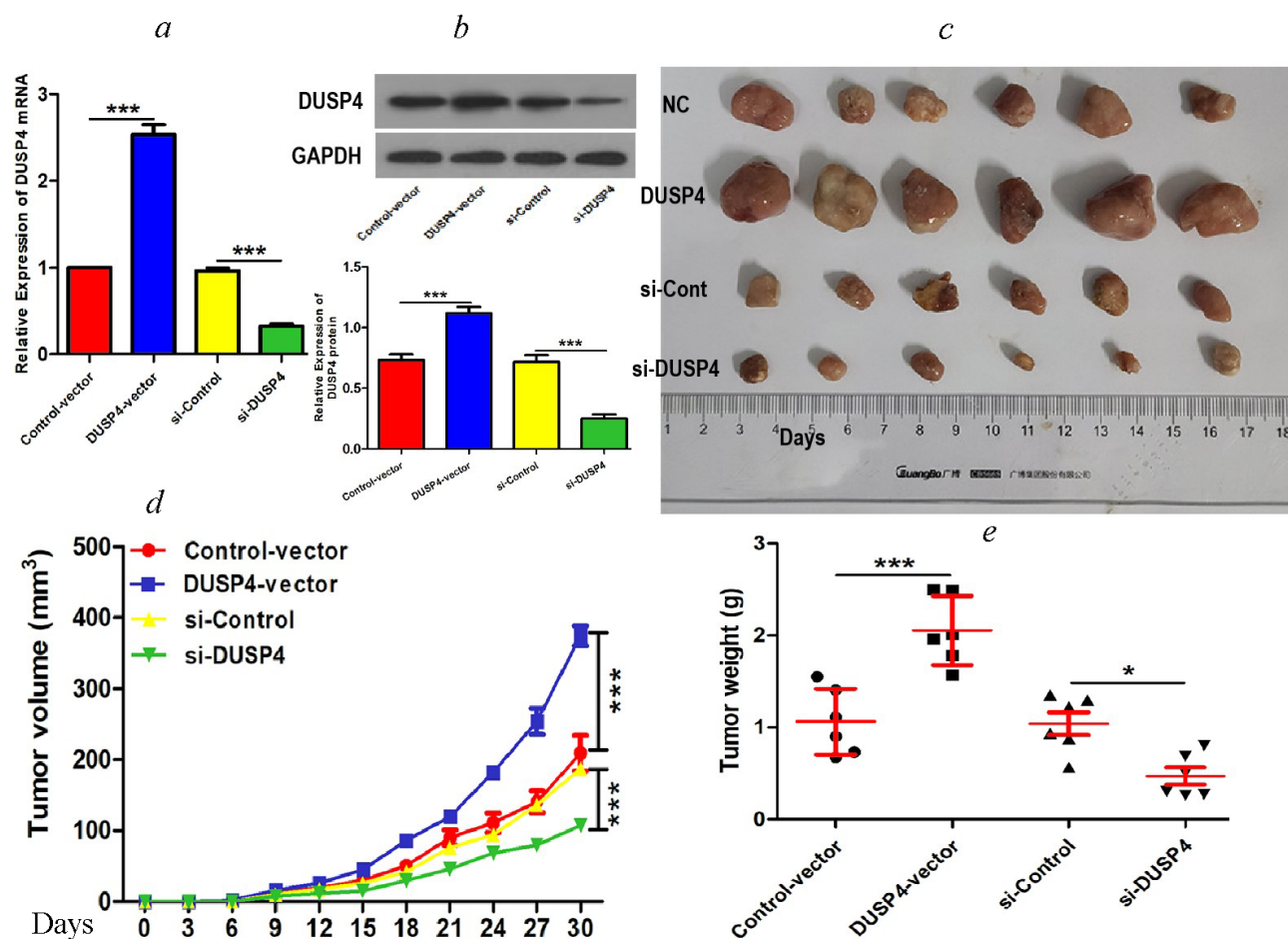


Рис. 4. Сверхэкспрессия DUSP4 способствует онкогенности клеток ППП, в то время как нокдаун DUSP4 имеет противоположный эффект. Трансфицированные вектором DUSP4, трансфицированные миРНК-DUSP4 или соответствующие контрольные клетки ТЕ-1 инокулировали бестимусным мышам. Спустя 30 дней мышей с опухолями умерщвляли, все опухоли удаляли и взвешивали. *a* – Экспрессия мРНК DUSP4 в опухолевых тканях 4 групп мышей, оцениваемая с помощью количественной ПЦР ($n = 6$). *b* – Экспрессия белка DUSP4 в опухолевых тканях из четырех групп мышей, оцениваемая с помощью вестерн-блоттинга ($n = 6$). *c* – Репрезентативные изображения удаленных у мышей опухолей. *d* – Объем опухоли измеряли каждые три дня для каждой мыши и строили кривую роста объема опухоли ($n = 6$). *e* – Сравнение веса опухолей ($n = 6$). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по однофакторному анализу ANOVA. Примечание. NC – удаленные у мышей опухоли с клетками, трансфицированными контрольным вектором; DUSP4 – удаленные опухоли с клетками, трансфицированными вектором DUSP4

лее того, сверхэкспрессия DUSP4 приводит к повышенной пролиферации клеток линий КРР [23]. Таким образом, становится ясно, что DUSP4 не только активно экспрессируется в различных опухолевых тканях, но также служит промотором роста и распространения некоторых опухолей пищеварительного тракта. Тем не менее публикаций о роли DUSP4 в развитии РП (особенно ПРП) не так много. Как и ожидалось, уровень экспрессии DUSP4 был повышен в тканях и клеточных линиях ПРП по сравнению с доброкачественными тканями и нормальной линией эпителиальных клеток пищевода. Также следует отметить, что экспрессия DUSP4 в раковых тканях также усиливалась с ростом и метастазированием ПРП. Корреляционный анализ

между экспрессией DUSP4 и клинико-патологическими особенностями показал, что повышенная экспрессия DUSP4 ассоциирована с более низкой общей выживаемостью. Соответственно, приведенные выше данные позволяют рассматривать DUSP4 в качестве нового прогностического биомаркера при ПРП.

Функциональные анализы *in vitro* и *in vivo* показали, что сверхэкспрессия DUSP4 способствует пролиферации, инвазии, миграции и канцерогенности клеток ПРП в моделях на животных. Напротив, нокдаун DUSP4 подавлял пролиферацию, инвазию, миграцию и онкогенность клеток ПРП в моделях на животных. Эти результаты предполагают, что DUSP4 может служить потенциальной терапевтической ми-

шению при ПРП. DUSP4 может играть двойную роль в ингибировании и стимулировании канцерогенеза; при этом DUSP4 оказывает положительное влияние на некоторые опухоли пищеварительного тракта. Канцерогенез ПРП, стимулируемый DUSP4, может быть связан с конкретными характеристиками опухоли, что требует дальнейшего исследования. Основываясь на анализе клинических образцов ткани и исследованиях *in vivo*, стоит отметить, что повышенная экспрессия DUSP4 является признаком большего размера опухоли. Хорошо известно, что уровень гипоксии может положительно коррелировать с ростом опухоли. В проведенном ранее исследовании было продемонстрировано, что гипоксия может приводить к ингибированию активности деметилазы, что, в свою очередь, приводит к метилированию генов, что в конечном итоге препятствует экспрессии генов-супрессоров опухоли и способствует росту опухоли [30]. Примечательно, что сверхэкспрессия DUSP4 может предотвращать гибель клеток, вызванную гипоксией/реоксигенацией, за счет активации эндотелиальной синтазы оксида азо-

та (eNOS) [31]. Соответственно, мы предполагаем, что DUSP4 способствует росту опухоли ПРП при гипоксии, что может быть потенциальным механизмом регулируемого DUSP4 онкогенеза при ПРП. Взаимосвязь между экспрессией DUSP4, уровнем гипоксии и онкогенезом при ПРП требует всестороннего и глубокого исследования в будущем.

Мы продемонстрировали стимулирующий эффект LSD1 на экспрессию DUSP4 в ПРП и вклад DUSP4 в рост и развитие ПРП. LSD1 также может играть ключевую роль в патогенезе ПРП посредством DUSP4-сигналинга. Как и ожидалось, ZY0511 ингибировал пролиферацию, инвазию и миграцию клеток ПРП до уровня, аналогичного наблюдаемому при нокдауне DUSP4. Важно отметить, что сверхэкспрессия DUSP4 могла быть обращена ингибирующим действием ZY0511 на вышеуказанные параметры в клетках ПРП. Приведенные выше данные указывают на то, что положительная регуляция DUSP4, по крайней мере частично, опосредует роль LSD1 в патогенезе ПРП. Тем не менее результаты настоящей работы ограничены отсут-

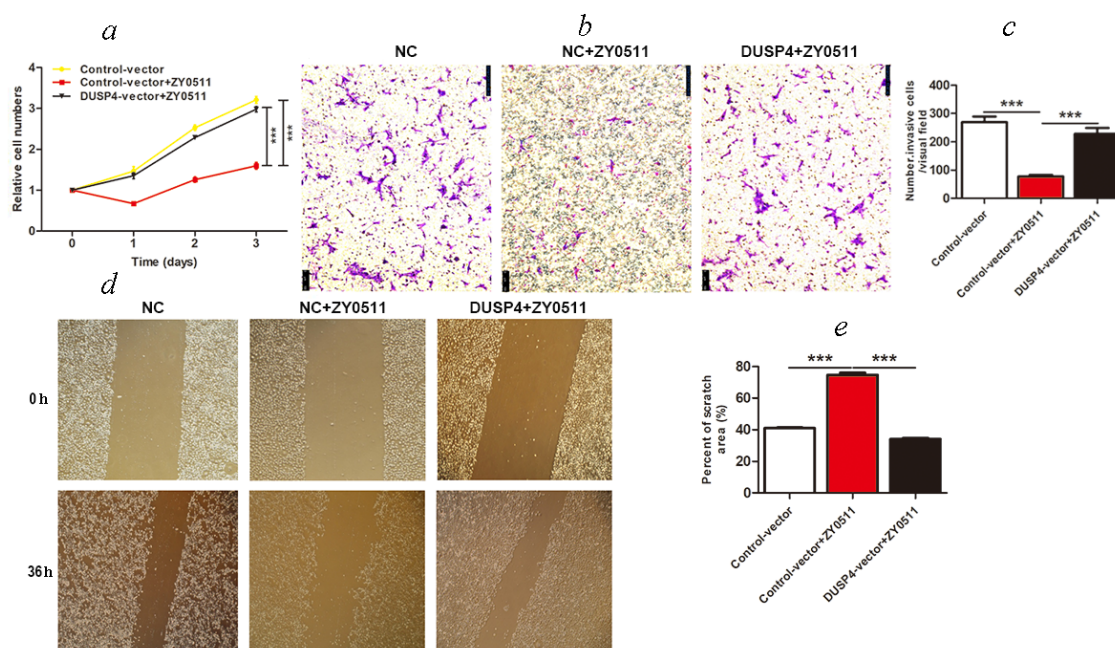


Рис. 5. Сверхэкспрессия DUSP4 обращает ZY0511-ингибирующее действие на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток ПРП. *a* – Пролиферация клеток TE-1, трансфицированных указанными плазмидами, оцениваемая с помощью анализа ССК-8 в присутствии или в отсутствие 2 мкМ ZY0511. *b, c* – Инвазия клеток TE-1, трансфицированных указанными плазмидами, оцениваемая путем анализа миграции в Transwell-системе в присутствии или в отсутствие 2 мкМ ZY0511 (масштаб 200 мкм). *d* – Миграция клеток TE-1, трансфицированных указанными плазмидами, оцениваемая с помощью скретч-тестов в присутствии или в отсутствие 2 мкМ ZY0511. Изображения получали под микроскопом через 0 и 36 ч. *e* – Коэффициенты миграции клеток (36 ч/0 ч) показаны на гистограмме. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов. *** $p < 0,001$ по результатам однофакторного дисперсионного анализа. Примечание. NC – группа клеток, трансфицированных контрольным вектором; NC + ZY0511 – клетки, трансфицированные контрольным вектором, обработанные ZY0511; DUSP4 + ZY0511 – клетки, трансфицированные вектором DUSP4, обработанные ZY0511

ствием исследований, показывающих насколько сверхэкспрессированный LSD1 способствует экспрессии DUSP4 в ПРП. Подробные механизмы, лежащие в основе регулируемой LSD1 экспрессии DUSP4 в ПРП, требуют дальнейшего изучения. Деметилирующая функция LSD1 делает HIF-1 α устойчивым к деградации, опосредованной метилированием [32]. Кроме того, LSD1 косвенно репрессирует деградацию, опосредованную гидроксилированием HIF-1 α [32]. Более того, деметилирование RACK1 с помощью LSD1 ингибирует RACK1-опосредованную деградацию HIF-1 α [32]. Соответственно, LSD1 также является ключевым регуляторным сигналом для раковых клеток при адаптации к гипоксическому микроокружению [32]. Следовательно, усиление адаптации клеток ПРП к гипоксии является возможным механизмом онкогенеза ПРП, регулируемым осью LSD1/DUSP4; это также требует дополнительных исследований.

В заключение, настоящее исследование продемонстрировало роль DUSP4 как нижестоящего по отношению к LSD1 онкогенного фактора при ПРП, что в некоторой степени объясняет регуляцию патогенеза ПРП, ассоциированную с LSD1. Что еще более важно, благодаря выявлению нижестоящих молекул, регулируемых LSD1, наши экспериментальные данные не только позволяют рассматривать DUSP4 в качестве многообещающего прогностическо-

го биомаркера при ПРП, но также указывают на возможные пути улучшения терапевтических стратегий при лечении ПРП – таким образом, DUSP4 может быть потенциально эффективной мишенью для подавления онкогенеза при ПРП.

Финансирование. Настоящая работа поддержана проектами фундаментальных научных исследований Научно-исследовательских институтов общественного благосостояния провинции Фуцзянь (2016R1029-2, 2019R1011-3) и Проектом обучения талантов в области научных исследований в области здравоохранения и планирования семьи провинции Фуцзянь (2018-ZQN-20).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные инструкции по уходу и использованию лабораторных животных.

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 86, вып. 12, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pennathur, A., Gibson, M. K., Jobe, B. A., and Luketich, J. D. (2013) Oesophageal carcinoma, *Lancet*, **38**, 400-412.
- Umar, S. B., and Fleischer, D. E. (2018) Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention, *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, **5**, 517-526.
- Matsuda, T., Ajiki, W., Marugame, T., Ioka, A., Tsukuma, H., et al. (2011) Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: a chronological and international comparative study, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **41**, 40-51.
- McGraw, S., Vigneault, C., and Sirard, M. A. (2007) Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine *in vitro* embryo development, *Reproduction*, **133**, 597-608.
- Wang, Q., Xu, X., Li, J., Liu, J., Gu, H., et al. (2011) Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells, *Cell. Res.*, **21**, 1424-1435.
- Sakane, N., Kwon, H. S., Pagans, S., Kaehlcke, K., Mizusawa, Y., et al. (2011) Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1), *PLoS Pathog.*, **7**, e1002184.
- Ly, T., Yuan, D., Miao, X., Ly, Y., Zhan, P., et al. (2012) Overexpression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer, *PLoS One*, **7**, e35065.
- Amente, S., Lania, L., and Majello, B. (2013) The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1829**, 981-986.
- Ding, J., Zhang, Z. M., Xia, Y., Liao, G. Q., Pan, Y., et al. (2013) LSD1-mediated epigenetic modification contributes to proliferation and metastasis of colon cancer, *Br. J. Cancer*, **109**, 994-1003.
- Wu, Y., Wang, Y., Yang, X. H., Kang, T., Zhao, Y., et al. (2013) The deubiquitinase USP28 stabilizes LSD1 and confers stem-cell-like traits to breast cancer cells, *Cell. Rep.*, **5**, 224-236.
- Yu, Y., Wang, B., Zhang, K., Lei, Z., Guo, Y., et al. (2013) High expression of lysine-specific demethylase 1 correlates with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **437**, 192-198.
- Hoshino, I., Akutsu, Y., Murakami, K., Akanuma, N., Isozaki, Y., et al. (2016) Histone demethylase LSD1 inhibitors prevent cell growth by regulating gene expression in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Ann. Surg. Oncol.*, **23**, 312-320.
- Wang, B., Zhao, B., Pang, L. P., Zhao, Y. D., Guo, Q., et al. (2017) LPE-1, an orally active pyrimidine derivative, inhibits growth and mobility of human esophageal cancers by targeting LSD1, *Pharmacol. Res.*, **122**, 66-77.
- Alsager, S. F., Tashkandi, M. M., Kartha, V. K., Yang, Y. T., Alkheriji, Y., et al. (2017) Inhibition of LSD1 epigenetically attenuates oral cancer growth and metastasis, *Oncotarget*, **8**, 73372-73386.
- Lu, Z., Ren, Y., Zhang, M., Fan, T., Wang, Y., et al. (2018) FLI-06 suppresses proliferation, induces apoptosis and cell cycle arrest by targeting LSD1 and Notch pathway in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Biomed. Pharmacother.*, **107**, 1370-1376.

16. Hou, G., Zhao, Q., Zhang, M., Wang, P., Ye, H., et al. (2019) LSD1 regulates Notch and PI3K/Akt/mTOR pathways through binding the promoter regions of Notch target genes in esophageal squamous cell carcinoma, *Onco Targets. Ther.*, **12**, 5215-5225.
17. Peng, W., Zhang, H., Tan, S., Li, Y., Zhou, Y., et al. (2020) Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil with the novel LSD1 inhibitor ZY0511 in colorectal cancer, *Ther. Adv. Med. Oncol.*, **12**, 1758835920937428.
18. Li, Y., Tao, L., Zuo, Z., Zhou, Y., Qian, X., et al. (2019) ZY0511, a novel, potent and selective LSD1 inhibitor, exhibits anticancer activity against solid tumors via the DDIT4/mTOR pathway, *Cancer Lett.*, **454**, 179-190.
19. Li, S., Lin, Z., Zheng, W., Zheng, L., Chen, X., et al. (2019) IL-17A inhibits autophagic activity of HCC cells by inhibiting the degradation of Bcl2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **509**, 194-200.
20. Popova, E. Y., Pinzon-Guzman, C., Salzberg, A. C., Zhang, S. S., and Barnstable, C. J. (2016) LSD1-mediated demethylation of H3K4me2 is required for the transition from late progenitor to differentiated mouse rod photoreceptor, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 4563-4581.
21. Liu, Y. W., Xia, R., Lu, K., Xie, M., Yang, F., et al. (2017) LincRNAFEZF1-AS1 represses p21 expression to promote gastric cancer proliferation through LSD1-Mediated H3K4me2 demethylation, *Mol. Cancer*, **16**, 39.
22. Gaedcke, J., Grade, M., Jung, K., Camps, J., Jo, P., et al. (2010) Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas, *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 1024-1034.
23. Gröschl, B., Bettstetter, M., Giedl, C., Woenckhaus, M., Edmonston, T., et al. (2013) Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation, *Int. J. Cancer*, **132**, 1537-1546.
24. Wang, H. Y., Cheng, Z., and Malbon, C. C. (2003) Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer, *Cancer Lett.*, **191**, 229-237.
25. Yin, Y., Liu, Y. X., Jin, Y. J., Hall, E. J., and Barrett, J. C. (2003) PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signaling apoptosis and growth suppression, *Nature*, **422**, 527-531.
26. Yip-Schneider, M. T., Lin, A., and Marshall, M. S. (2001) Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 992-997.
27. Zhang, R., Wang, G., Zhang, P. F., Zhang, J., Huang, Y. X., et al. (2017) Sanguinarine inhibits growth and invasion of gastric cancer cells via regulation of the DUSP4/ERK pathway, *J. Cell. Mol. Med.*, **21**, 1117-1127.
28. Xu, X. F., Gao, F., Wang, J. J., Tao, L., Ye, J. S., et al. (2018) MiR-122-5p inhibits cell migration and invasion in gastric cancer by down-regulating DUSP4, *Cancer. Biol. Ther.*, **19**, 427-435.
29. De Vriendt, V., De Roock, W., Di Narzo, A. F., Tian, S., et al. (2013) DUSP 4 expression identifies a subset of colorectal cancer tumors that differ in MAPK activation, regardless of the genotype, *Biomarkers*, **18**, 516-524.
30. Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D'Anna, F., Kuchnio, A., et al. (2016) Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity, *Nature*, **537**, 63-68.
31. Dougherty, J. A., Kilbane Myers, J., Khan, M., Angelos, M. G., and Chen, C. A. (2017) Dual-specificity phosphatase 4 overexpression in cells prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis via the upregulation of eNOS, *Front. Cardiovasc. Med.*, **4**, 22.
32. Kim, D., Kim, K. I., and Baek, S. H. (2021) Roles of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in homeostasis and diseases, *J. Biomed. Sci.*, **28**, 41.

LYSINE-SPECIFIC HISTONE DEMETHYLASE 1 PROMOTES ONCOGENESIS OF THE ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA BY UPREGULATING DUSP4

J. Han^{1,2#}, S. Ye^{3#}, J. Chen^{1,2}, K. Wang^{1,2}, J. Jin^{1,2}, Z. Zeng^{3*}, and S. Xue^{1,2*}

¹ Department of Immunization, Fujian Academy of Medical Sciences, 350003 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: fyykxysj@126.com

² Fujian Institute of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, 350003 Fuzhou, Fujian, China

³ Department of Cardiothoracic Surgery, 900 Hospital of the Joint Logistics Team, 350025 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: 13809542597@139.com

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is a predominant subtype of esophageal cancer (EC) and has a poor prognosis due to its aggressive nature. Accordingly, it is necessary to find novel prognostic biomarkers and therapeutic targets for ESCC. Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1) plays a core role in the regulation of ESCC oncogenesis. However, the detailed mechanism of LSD1-regulated ESCC growth has not been elucidated. This study aims to explore molecular mechanism underlying the LSD1-regulated ESCC's oncogenesis. After LSD1 silencing, we detected differentially expressed genes (DEGs) in human ESCC cell line, TE-1, by transcriptome sequencing. Subsequently, we investigated expression pattern of the selected molecules in the ESCC tissues and cell lines by qRT-PCR and Western blotting. Furthermore, we explored the roles of selected molecules in ESCC using gene silencing and overexpression assays. Transcriptome sequencing showed that the expression of dual specificity phosphatase 4 (DUSP4) in TE-1 was significantly attenuated after the *LSD1* silencing. In addition, the *DUSP4* mRNA expression level was significantly higher in the ESCC tissues, especially in those derived from patients with invasion or metastasis. Moreover, the *DUSP4* expression was positively associated with the *LSD1* expression in the ESCC tissues. *DUSP4* overexpression promoted proliferation, invasion, and migration of the ESCC cells, while *DUSP4* silencing had an opposite effect. *DUSP4* overexpression also enhanced tumorigenicity of the ESCC cells *in vivo*, while *DUSP4* silencing inhibited tumor growth. Importantly, inhibition of cell proliferation, invasion, and migration by the *LSD1* inhibitor (ZY0511) was reversed by *DUSP4* overexpression. Conclusively, we found that *LSD1* promotes ESCC's oncogenesis by upregulating *DUSP4*, the potential therapeutic and diagnostic target in ESCC.

Keywords: dual specificity phosphatase 4, esophageal squamous cell carcinoma, lysine-specific histone demethylase 1

УДК 577.114.4

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ КВАТЕРНИЗИРОВАННОГО ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ОСТАТКОМ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ, ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

© 2022 Д.Б. Киселевский^{1*}, А.В. Ильина², А.П. Луньков²,
В.П. Варламов², В.Д. Самуилов¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: dkiselevs@mail.ru

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биоинженерии имени К.Г. Скрябина, лаборатория инженерии биополимеров, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.11.2021

После доработки 15.12.2021

Принята к публикации 22.12.2021

Синтезирован хитозан, модифицированный (2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильной группой и остатком галловой кислоты — кватернизированный хитозан с галловой кислотой (КХГ). Исследованы его антиоксидантные свойства. Пероксидаза в комбинации с NADH и салицилгидроксаматом (СГ) вызывала поглощение кислорода и образование H_2O_2 в водном растворе в результате восстановления O_2 в пероксидазно-оксидазных реакциях. КХГ снижал скорости поглощения O_2 и образования H_2O_2 . Таким же действием обладали антиоксидант пропиленгаллат (ПГ) и супероксиддисмутаза (СОД), но не кватернизированный хитозан (КХ) без галловой кислоты. Испытан эффект производных хитозана на образование активных форм кислорода (АФК) в клетках эпидермиса гороха и их гибель, которую регистрировали по разрушению клеточных ядер. КХГ, КХ и СОД не оказывали эффекта, а ПГ уменьшал скорость образования АФК в клетках эпидермиса, которое было вызвано NADH с СГ или менадионом. КХГ и КХ предотвращали разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха, вызванное NADH с СГ или KCN. СОД не оказывала влияния на разрушение ядер, а действие ПГ зависело от индуктора гибели клеток. Подавление разрушения ядер производными хитозана связано не с их антиоксидантным действием, а с повреждением плазматической мембраны клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что КХГ проявляет антиоксидантные свойства в растворах, но не препятствует образованию АФК в клетках растений. Механизм его антиоксидантного действия сходен с таковыми для ПГ и СОД.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хитозан, кватернизированный хитозан, пероксидаза, супероксиддисмутаза, активные формы кислорода, пропиленгаллат.

DOI: 10.31857/S0320972522010080

ВВЕДЕНИЕ

Хитин — основной структурный полисахарид покровов членистоногих и один из важнейших компонентов клеточных стенок грибов. Он состоит из остатков N-ацетилглюкозамина, соединённых β -1,4-гликозидными связями. Дезацетилированием хитина получают хитозан,

включающий остатки N-ацетилглюкозамина и глюкозамина. В отличие от хитина хитозан растворим в кислых водных растворах и обладает большей реакционной способностью благодаря свободным аминогруппам в составе полимера. Модификация хитозана различными химическими группами усиливает его реакционную способность. Хитозан и его производные проявляют антимикробное, антиоксидантное и иммуномодулирующее действия. Благодаря своим свойствам они могут использоваться в различных отраслях промышленности и в здравоохранении [1]. Из-за биоразлагаемости, антимикробных и антиоксидантных свойств, которые важны при хранении пищевых продуктов, перспективно применение хитозана и его

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; КХ — кватернизированный хитозан; КХГ — кватернизированный хитозан с галловой кислотой; ПГ — пропиленгаллат; СГ — салицилгидроксамат; СОД — супероксиддисмутаза; Amplex Red — N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин; DCF — 2',7'-дихлорфлуоресцеин; DCFH-DA — диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина; PI — йодид пропидия.

* Адресат для корреспонденции.

производных в качестве упаковочных материалов [2].

Противомикробные эффекты хитозана, предположительно, включают агглютинацию клеток микроорганизмов, повреждение их клеточной мембраны, угнетение роста микроорганизмов и продукции ими токсинов за счёт хелатирования металлов хитозаном, ингибирование транскрипции и трансляции, подавление активности H^+ -АТФазы и хемиосмосмотически регулируемого транспорта веществ [3]. Антимикробную активность хитозана определяют его молекулярная масса и катионный заряд [2].

Синтезировано производное хитозана, в котором к аминогруппе в остатке глюкозамина присоединена (2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильная группа (реакция кватернизации). Коммерчески доступный алкилирующий агент (хлорид глицидилтриметиламмония), одностадийность и селективность реакции делают получение катионных производных хитозана данного типа наиболее привлекательным [4]. Кватернизированный хитозан обладал более широким интервалом растворимости (рН 3–11), чем исходный хитозан, а также эффективнее подавлял рост бактерий и грибов [5].

Хитозан и его производные взаимодействуют с активными формами кислорода (АФК). Низкомолекулярный хитозан обладал более сильным антиоксидантным действием, чем высокомолекулярный [6]. Кватернизация хитозана путём присоединения триметиламмонийной группы к атому азота усиливала его антиоксидантные свойства [7]. Для утилизации АФК перспективны производные хитозана, содержащие галловую кислоту [8] в качестве антиоксиданта [9, 10].

Антиоксидантные свойства галловой кислоты могут усиливаться в результате её связывания с полимером. Полисахарид ламинарин, модифицированный галловой кислотой, проявлял большую антиоксидантную активность, чем ламинарин и галловая кислота сами по себе [11]. Анализ свойств галловой кислоты и её конъюгата с хитозаном показал, что эффективность полимера как антиоксиданта в модели перекисного окисления линолевой кислоты была выше [12].

Немодифицированный хитозан обладает множеством эффектов на клетки растений: повышает их иммунную защиту, инициирует гибель клеток, усиливает образование АФК, вызывает приток Ca^{2+} в клетки, активирует MAP-киназы, ингибирует H^+ -АТФазу плазматической мембраны, стимулирует синтез фитогормонов и вызывает изменение хроматина [3, 13]. На поверх-

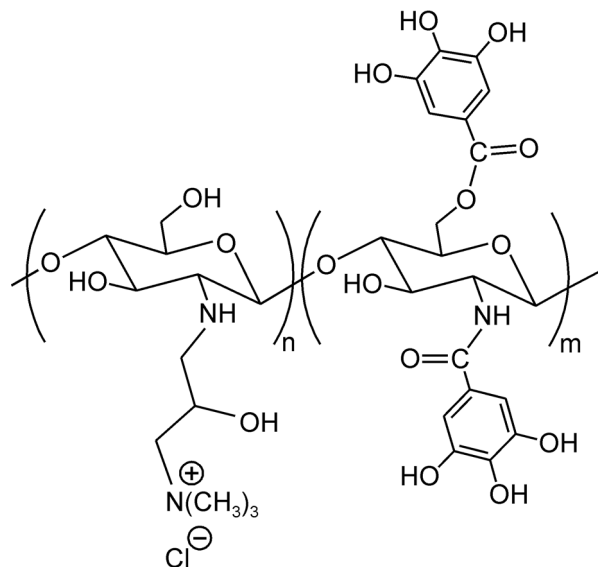


Рис. 1. Структура КХГ

ности клеток растений имеются рецепторы, распознающие хитиновые олигосахариды и инициирующие иммунный ответ к фитопатогенным грибам [14]. Однако полностью дезацетилированные хитозановые олигомеры не связываются с рецепторами для хитина [15]. Таким образом, хитозан до сих пор остаётся РAMP (pathogen-associated molecular pattern), для которого не найден специфичный рецептор PRR (pattern recognition receptor) [13].

Судя по данным литературы, присоединение галловой кислоты к полимеру на основе хитозана будет усиливать его антиоксидантное действие. Благодаря своим антиоксидантным и противомикробным свойствам, а также растворимости кватернизированный хитозан представляется хорошей платформой для такой модернизации. Кроме того, от этого производного можно ожидать меньшего вмешательства в процессы, протекающие внутри клеток, по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами и обычным хитозаном.

Получено производное низкомолекулярного хитозана, модифицированное (2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильной группой и природным фенольным антиоксидантом — галловой кислотой (КХГ). Его структура представлена на рис. 1. В качестве контроля и исходного соединения для синтеза КХГ использован кватернизированный хитозан (КХ) без галловой кислоты. Цель работы — изучить антиоксидантные свойства КХГ в сравнении с КХ, а также испытать действие этих производных хитозана на образование АФК в клетках растений и их гибель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

КХ (N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид) синтезирован на основе хитозана с молекулярной массой 20 кДа и степенью дезацетилирования 98% в результате взаимодействия с (2,3-эпоксипропил)триметиламмоний хлоридом в водной среде. Степень замещения по данным кондуктометрического титрования и ^1H ЯМР составила 58% [5].

КХГ получали в результате введения в КХ остатков галловой кислоты с использованием (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид [16]. Содержание галловой кислоты было определено с использованием реактива Фолина—Чокалтеу и составило 163 мг/г полимера.

Содержание O_2 в растворе регистрировали в полярографической ячейке при помощи закрытого платинового электрода, подключенного к аналого-цифровому преобразователю Record4 (Пушино, Россия), с использованием сопутствующего программного обеспечения. Полярографическая ячейка объемом 1,5 мл содержала среду инкубации: 50 mM Tricin-KOH (pH 7,8), 35 mM NaCl и 1 mM MgCl_2 . В полярографическую ячейку последовательно вносили реагенты.

Содержание H_2O_2 в растворе измеряли методом флуориметрии с применением N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина, Amplex Red, («Molecular Probes», США). Реакция нефлуоресцирующего Amplex Red с H_2O_2 катализируется пероксидазой и ведёт к образованию флуоресцирующего резорурфина [17, 18]. В пластиковую кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 mM Tricin-KOH (pH 7,8), 35 mM NaCl и 1 mM MgCl_2 , последовательно добавляли Amplex Red и другие реагенты. Флуоресценцию резорурфина детектировали с помощью флуориметра VersaFluor («Bio-Rad», США), возбуждая её светом 505–515 нм и регистрируя при 585–595 нм.

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорт Альфа) выращивали 11–18 сут. при периодическом освещении (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ, 250 Вт, с интенсивностью света $\sim 100 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp («Hansatech», Великобритания). Плёнки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом.

АФК в клетках гороха определяли по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося из нефлуоресцирующего диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA). Проникая в клетки через плазматическую мембрану, DCFH-DA дезацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно

но H_2O_2 с участием пероксидаз, превращаясь во флуоресцирующий DCF. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром c, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [19, 20]. Плёнку эпидермиса, закреплённую на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 mM Tricin-KOH (pH 7,8), 35 mM NaCl и 1 mM MgCl_2 . В кювету последовательно добавляли DCFH-DA и другие реагенты. Флуоресценцию DCF измеряли с помощью флуориметра VersaFluor, возбуждая её светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм.

Для определения действия реагентов на состояние клеток плёнки эпидермиса помещали в 2 мл бидистиллированной воды в полистирольных планшетах, добавляли реагенты и инкубировали. Контроль — без добавок реагентов. Условия инкубации представлены в подписях к рисункам.

Гибель клеток гороха регистрировали по разрушению клеточных ядер [21]. После инкубации эпидермис 5 мин обрабатывали фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5/5/1/1), промывали в этиловом спирте и воде в течение 10 и 5 мин соответственно, затем окрашивали ядерным красителем гематоксилином Карацци в течение 1 ч. Окрашенные плёнки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе Primo Star («Carl Zeiss», Германия). Для каждого варианта опыта определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишёнными ядер.

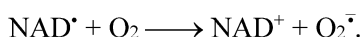
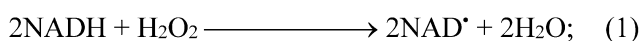
Проницаемость плазматической мембраны клеток определяли с помощью флуоресцирующего красителя йодида пропидия (PI, («Fluka», США)), связывающегося с ДНК клеточных ядер и не проникающего через неповреждённую мембрану [22]. После инкубации плёнки эпидермиса окрашивали 2 мкМ PI в течение 20 мин и исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss»). Флуоресценцию PI возбуждали светом 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Подсчитывали долю клеток, в ядрах которых флуоресцирует PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

Для определения количества клеток с разрушенными ядрами или с проницаемой для PI клеточной мембраной в каждом варианте опыта исследовали 300–600 клеток в 2–3 плёнках эпидермиса. Эксперименты повторяли 2–3 раза. Приводятся результаты типичных экспериментов: средние значения $\pm 95\%$ -ные доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

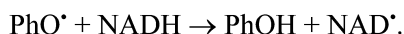
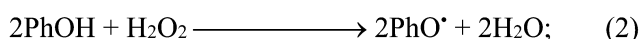
Испытано действие КХГ в системе, генерирующей супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$). Используя NADH как донор электронов, фермент пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7) катализирует реакции с образованием $O_2^{\cdot-}$, называемые пероксидазно-оксидазными [23]:

Пероксидаза



NADH восстанавливает пероксидазу и без H_2O_2 . H_2O_2 или O_2 впоследствии нужны для возвращения фермента в исходное состояние [23]. Ряд фенольных соединений (PhOH), включая использованный в работе салицилгидроксамат (СГ), — субстраты пероксидазы, которые ускоряют окисление NADH и образование $O_2^{\cdot-}$ [24, 25]:

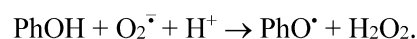
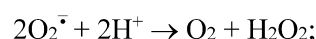
Пероксидаза



Оксиметрически регистрировали содержание O_2 в водном растворе. Пероксидаза, NADH и СГ инициировали поглощение O_2 в результате его восстановления до $O_2^{\cdot-}$ (рис. 2). В этой реакции СГ можно заменить другим соединением

фенольной природы, например, фенолом или 2,4-дихлорфенолом, но не салициловой кислотой [26]. Реакция шла с высокой скоростью лишь после добавки всех трёх компонентов в любой последовательности. Антиоксидант пропилгаллат (ПГ) подавлял поглощение O_2 (рис. 2, а). КХГ (рис. 2, б и в), но не КХ (рис. 2, в), снижал скорость поглощения O_2 . Супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая превращение $O_2^{\cdot-}$ в O_2 и H_2O_2 , также уменьшала скорость поглощения O_2 (рис. 2, г).

В результате спонтанной дисмутации [27] и в реакциях $O_2^{\cdot-}$ с NADH или фенольными соединениями (например, СГ) [23, 25] образуется H_2O_2 :



Таким образом, пероксидаза с NADH и СГ служит также и источником H_2O_2 , который детектировали флуориметрически с помощью Amplex Red. Добавка пероксидазы и H_2O_2 вызвала образование флуоресцирующего резорурфина (рис. 3, а). Величина квантового выхода флуоресценции зависела от концентрации H_2O_2 . Комбинация пероксидазы, NADH и СГ (независимо от последовательности их добавления) вела к росту выхода флуоресценции (рис. 3, б–д), который подавлялся каталазой, утилизирующей H_2O_2 , СОД (рис. 3, б) и ингибитором пероксида-

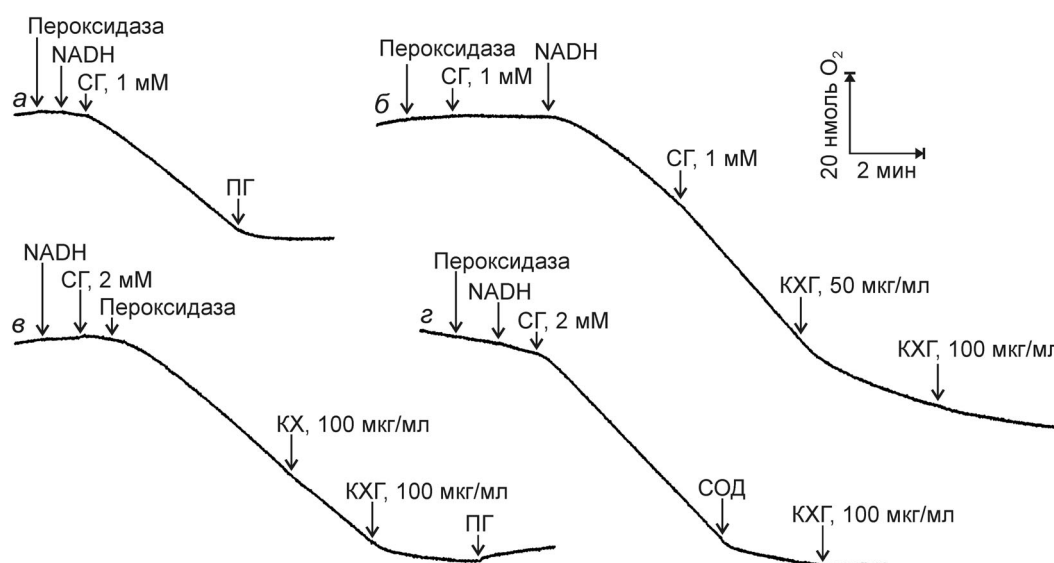


Рис. 2. Действие КХГ на поглощение O_2 в оксидазной реакции пероксидазы. Добавки: 40 ед. активности/мл пероксидазы хрена; 1 mM NADH; СГ, 0,2 mM ПГ; КХГ; КХ; 40 ед. активности/мл супероксиддисмутазы (СОД)

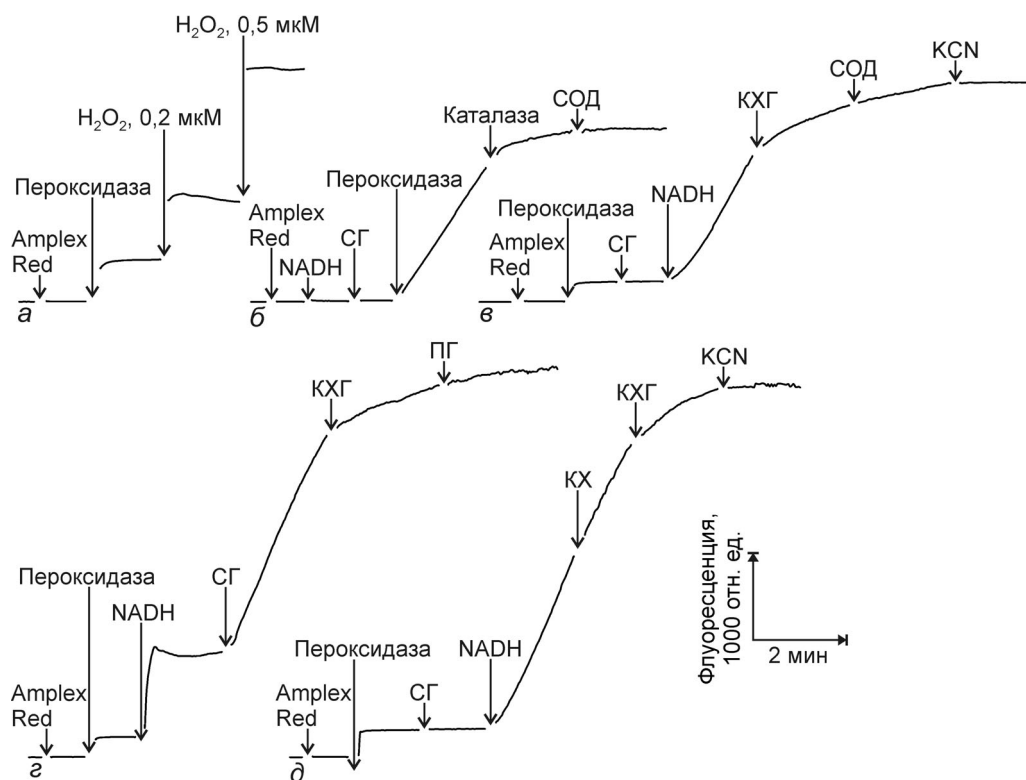


Рис. 3. Действие КХГ на H_2O_2 -зависимое образование флуоресцирующего резорфуина в результате окисления нефлуоресцирующего Amplex Red пероксидазой. Добавки: 5 мкМ Amplex Red; 20 (а) или 5 (б–д) ед. активности/мл пероксидазы хрена; H_2O_2 ; 0,1 мМ NADH; 0,5 мМ СГ; 40 ед. активности/мл каталазы; 20 ед. активности/мл СОД; 100 мкг/мл КХГ; 2,5 мМ KCN; 0,2 мМ ПГ; 100 мкг/мл КХ

зы KCN (рис. 3, в и д). Скорость образования флуоресцирующего резорфуина уменьшалась после добавки КХГ (рис. 3, в–д), но не КХ (рис. 3, д). Снижение скорости образования резорфуина СОД и ПГ на фоне добавленного КХГ было небольшим (рис. 3, в и г). Данные рис. 2 и 3 демонстрируют антиоксидантные свойства КХГ и свидетельствуют о сходстве эффектов КХГ, СОД и ПГ на образование АФК: O_2^- и H_2O_2 .

Может ли КХГ действовать как антиоксидант применительно к живым клеткам и защищать их от окислительного повреждения и гибели? Испытано действие КХГ на генерацию АФК в клетках эпидермиса, изолированных из листьев гороха. АФК в клетках детектировали по флуоресценции DCF. Добавка к плёнкам эпидермиса гороха NADH в комбинации с СГ вызвала образование АФК в клетках, проявляющееся в росте выхода флуоресценции (рис. 4, а). Клеточные мембраны непроницаемы для NADH, однако снаружи клеток в апопласте есть оксидоредуктазы, составляющие третью по величине группу среди всех белков клеточной стенки у растений. Около половины апопластных оксидоредуктаз – это пероксидазы [28, 29]. Ни КХГ, ни СОД не снижали скорость образования флуо-

ресцирующего DCF, в отличие от ПГ и KCN (рис. 4, а).

Другой индуктор образования АФК – менадион (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин K_3). Менадион в клетках подвергается окислению и восстанавливает O_2 [30, 31]. Менадион увеличивал скорость образования DCF, которая была нечувствительна к последующим добавкам КХ, КХГ и СОД, но снижалась ПГ и KCN (рис. 4, б).

Разрушение ядер клеток у растений – надёжный и удобный для микроскопии признак программируемой клеточной смерти (ПКС). Поскольку хлоропласты могут участвовать в ПКС у растений, инкубацию эпидермиса из листьев гороха с реагентами проводили в темноте или при освещении, т.е. в условиях, поддерживающих фотосинтез [21]. NADH вызывал разрушение ядер замыкающих клеток устьиц (устьичных клеток) в эпидермисе из листьев гороха (рис. 5). Эффект NADH не различался в темноте и на свету. СГ увеличивал NADH-зависимое разрушение ядер. КХ и КХГ в концентрации 20 мкг/мл, СОД и ПГ не влияли на разрушение ядер, вызванное NADH в комбинации с СГ. КХ и КХГ в концентрации 100 мкг/мл подавляли разрушение ядер, индуцированное NADH и СГ (рис. 5).

KCN, ингибирующий гем-содержащие ферменты, в том числе каталазу и пероксидазы, вызывал разрушение ядер устьичных клеток (рис. 6). Освещение усиливало эффект KCN, что соответствует данным, полученным ранее [21]. KCN воздействует на хлоропласты: выключает фотосинтетическое выделение O_2 , ингибируя рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу. Это должно вести к уменьшению пула конечного акцептора электронов $NADP^+$ и восстановлению компонентов фотосинтетической электронтранспортной цепи [32]. Ингибиторы переноса электронов и акцепторы электронов, окисляющие компоненты электронтранспортной цепи хлоропластов, уменьшали разрушение ядер устьичных клеток, которое вызывала инкубация эпидермиса из листьев гороха с KCN на свету. Анализ разрушения ядер устьичных клеток, имеющих хлоропласты, и основных клеток эпидермиса (эпидермальных клеток), не содержащих хлоропластов, позволил сделать вывод о влиянии света и участии хлоропластов в гибели клеток растений. KCN-Индуктированное разрушение клеточных ядер на свету зависит от АФК и редокс-состояния пластохинона [21]. Однако свет не влиял на разрушение ядер, вызванное NADH или NADH в комбинации с СГ (рис. 5). Учитывая, что NADH не проникает в клетки, и его эффект, предположительно, связан с пероксидазной активностью в апопласте, неудивительно, что действие NADH не зависит от освещения, в отличие от KCN.

KX и KXГ в темноте и на свету не оказывали эффекта при 20 мкг/мл и уменьшали количество клеток с разрушенными ядрами в концентрации

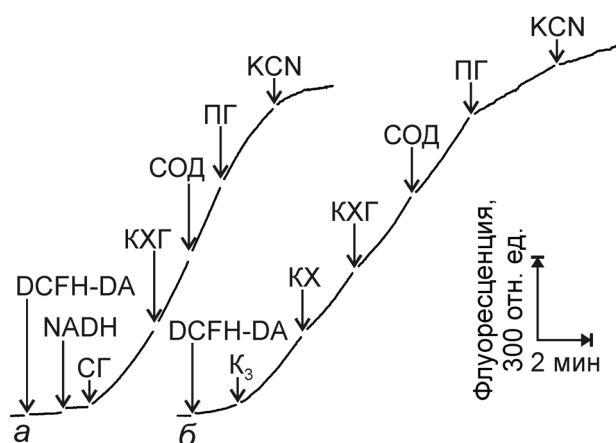


Рис. 4. Действие KXГ на H_2O_2 -зависимое образование флуоресцирующего DCF из нефлуоресцирующего DCFH-DA в клетках эпидермиса из листьев гороха. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA; 1 мМ NADH; 2 мМ СГ; 100 мкг/мл KXГ; 20 ед. активности/мл СОД; 0,5 мМ ПГ; 2,5 мМ KCN; 0,1 мМ менадиона (K_3); 100 мкг/мл КХ

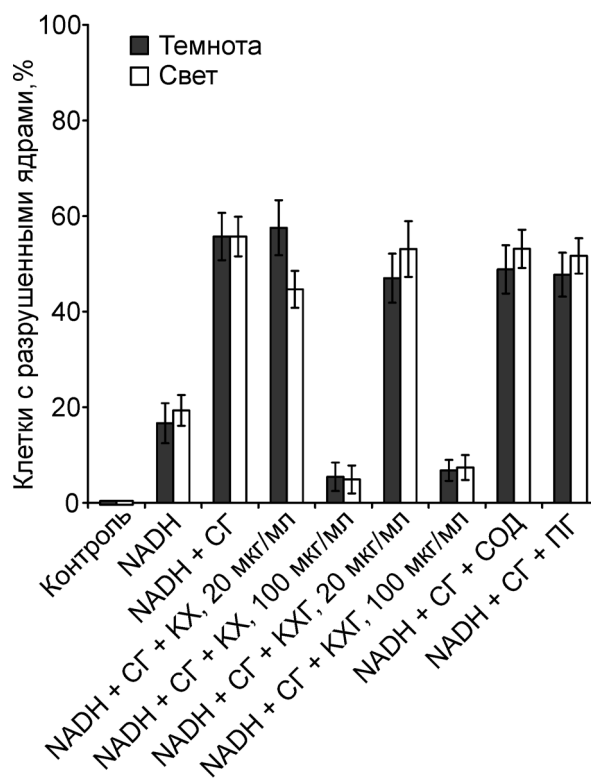


Рис. 5. Действие KX и KXГ на разрушение ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из листьев гороха, вызванное NADH и СГ. К плёнкам эпидермиса добавляли 4 мМ NADH; 2 мМ СГ; KX; KXГ; 40 ед. активности/мл СОД; 1 мМ ПГ и инкубировали 23 ч в темноте или на свету

100 мкг/мл. СОД не влияла на разрушение ядер, вызванное KCN, а ПГ ингибировал его (рис. 6).

ПГ не оказывал действия на разрушение ядер, зависящее от NADH и СГ (рис. 5), но предотвращал KCN-индуцированное разрушение ядер (рис. 6). ПГ эффективнее подавлял образование АФК, вызванное менадионом, а не NADH с СГ (рис. 4). По-видимому, эффект ПГ зависит от локализации источника АФК. Вероятно, также играет роль взаимодействие реагентов с компонентами митохондриальной электрон-транспортной цепи: KCN подавляет цитохром *c*-оксидазу, фермент основной ветви дыхательной цепи у растений, а СГ и ПГ — ингибиторы альтернативной оксидазы, нечувствительной к KCN [33]. Нарушение работы альтернативной оксидазы усиливает продукцию АФК митохондриями в клетках растений [34, 35].

Поликатионы хитозан, цитохром *c*, полилизин, полиэтиленмин и протамин, а также детергенты Triton X-100 и лауридиметиламин-N-оксид вызывали повреждение плазматической мембраны устьичных клеток, которое регистрировали по флуоресценции PI в клеточных ядрах. Этот краситель не проникает через интактную

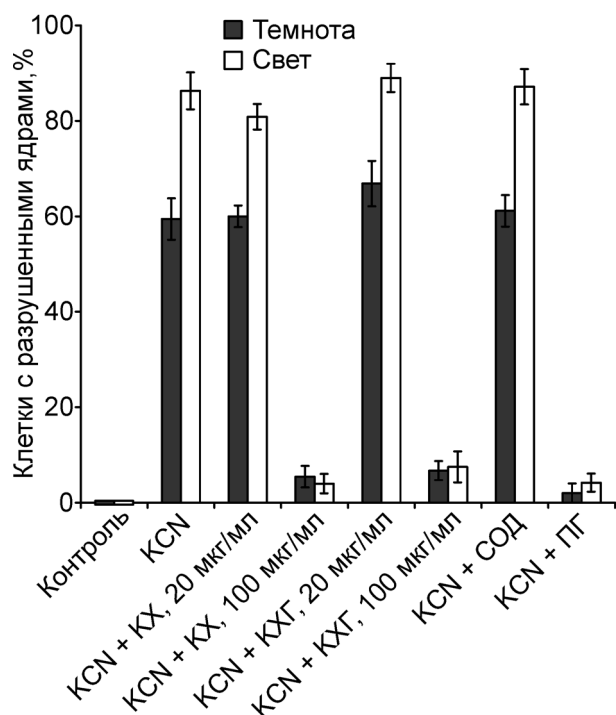


Рис. 6. Действие КХ и КХГ на KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из листьев гороха. К плёнкам эпидермиса добавляли 2,5 мМ KCN; КХ; КХГ; 20 ед. активности/мл СОД; 0,5 мМ ПГ и инкубировали 18 ч в темноте или на свету

клеточную мембрану. При этом детергенты и поликатионы предотвращали разрушение клеточных ядер, вызванное KCN [36, 37]. Повреждение плазматической мембраны — признак некроза, очевидно, может сопровождаться частичным высвобождением содержимого клетки, нарушением внутриклеточных процессов и препятствует разрушению ядер клеток.

Чем обусловлен эффект КХ и КХГ в концентрации 100 мкг/мл, который проявлялся в подавлении разрушения ядер, индуцированном NADH и СГ (рис. 5) или KCN (рис. 6): антиоксидантными свойствами или повреждением клеточной мембраны? Испытано действие КХ и КХГ на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI в сравнении с детергентом Triton X-100. Triton X-100 вызывал проникновение PI в клетки (рис. 7). КХ и КХГ в концентрации 20 мкг/мл не влияли на проницаемость плазматической мембраны клеток для PI, а в более высоких концентрациях (100 или 500 мкг/мл) способствовали проникновению PI в клетки (рис. 7). Данные показывают, что подавление разрушения ядер КХ и КХГ связано с повреждением клеточной мембраны.

Полученные результаты свидетельствуют об антиоксидантных свойствах КХГ. Они, очевидно,

но, зависят от остатка галловой кислоты в составе полимера, поскольку КХ не обладал действием, подобным КХГ (рис. 2 и 3). На рис. 8 представлены возможные химические реакции O_2^- с остатком галловой кислоты в КХГ, аналогичные предполагаемому взаимодействию O_2^- и ПГ [38]. ПГ, вероятно, каталитически осуществляет дисмутацию O_2^- , имитируя СОД [39]. Происходит окисление остатка галловой кислоты с образованием феноксильного радикала и H_2O_2 (1). Далее возможно его восстановление с выделением O_2 (2). Возможно также повторное окисление феноксильного радикала в реакции с O_2^- (3), которое ведёт к образованию H_2O_2 и впоследствии гидрокси-*o*-хинона [38]. Однако при этом O_2^- будет эквимольно превращён в H_2O_2 , а это противоречит данным с Amplex Red (рис. 3), в которых добавка КХГ снижала образование H_2O_2 . Поэтому представляется более вероятной реакция (2) или происходящее вслед за окислением феноксильного радикала (3) O_2^- -зависимое восстановление гидрокси-*o*-хинона с образованием O_2 (4). Суммарно реакции (1) и (2) и реакции (3) и (4) представляют собой дисмутацию O_2^- .

Первые работы, в которых описано включение остатка галловой кислоты в состав хитозана, опубликованы в 2009 г. [40, 41]. Присоединение галловой кислоты к хитозану и его производным,

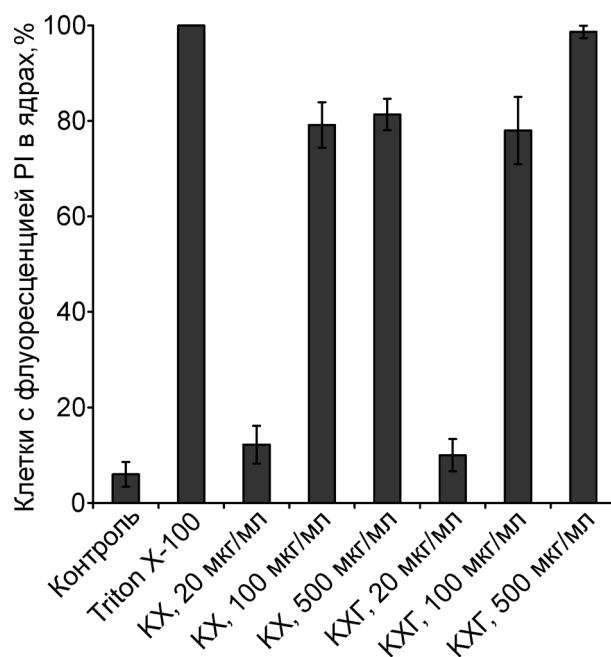


Рис. 7. Действие КХ и КХГ на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток в плёнках эпидермиса из листьев гороха для PI. К плёнкам эпидермиса добавляли 1 мМ Triton X-100, КХ, КХГ, инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке, а затем ещё 3 ч инкубировали в темноте без перемешивания

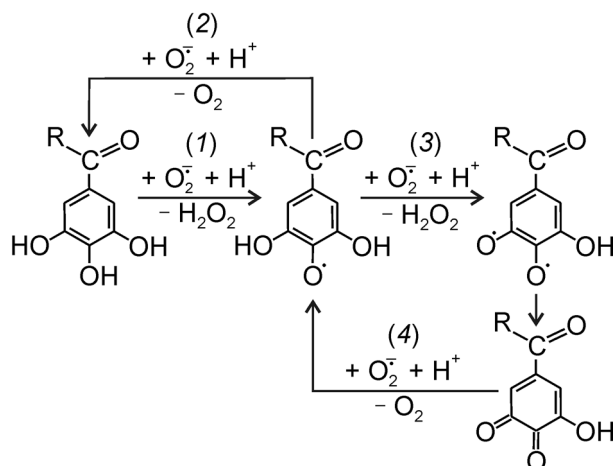


Рис. 8. Предполагаемые реакции остатка галловой кислоты в составе КХГ с O_2^- . R — остаток кватернизированного хитозана

в том числе кватернизированным, повышало антимикробный эффект и обеспечивало или в значительной степени усиливало антиоксидантную активность полимера, которую определяли различными методами *in vitro* и *in vivo* [42–45]. Таким образом, данные литературы соответствуют результатам настоящего исследования.

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что КХГ, в отличие от КХ, проявля-

ет антиоксидантные свойства в растворах, но не препятствует образованию АФК внутри клеток растений, как показывают опыты с DCF. По механизму его антиоксидантное действие сходно с ПГ и особенно с СОД. СОД и КХГ — высокомолекулярные соединения, не проникают в клетки и не защищают их от гибели, вызванной NADH с СГ или KCN. Однако, обладая, в отличие от СОД, свойствами поликатиона, КХГ в концентрации от 100 мкг/мл и выше вызывает повреждение плазматической мембраны клеток.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9, а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Работа по получению и анализу производных хитозана частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 20-016-00205).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang, W., Xue, C., and Mao, X. (2020) Chitosan: Structural modification, biological activity and application, *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 4532–4546, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042.
- Pal, K., Bharti, D., Sarkar, P., Anis, A., Kim, D., et al. (2021) Selected applications of chitosan composites, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10968, doi: 10.3390/ijms222010968.
- Malerba, M., and Cerana, R. (2016) Chitosan effects on plant systems, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 996, doi: 10.3390/ijms17070996.
- Andreica, B. I., Cheng, X., and Marin, L. (2020) Quaternary ammonium salts of chitosan. A critical overview on the synthesis and properties generated by quaternization, *Eur. Polym. J.*, **139**, 110016, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110016.
- Shagdarova, B., Lunkov, A., Il'ina, A., and Varlamov, V. (2019) Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.*, **124**, 994–1001, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.209.
- Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., et al. (2009) Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1690–1696, doi: 10.1016/j.carres.2009.05.006.
- Luan, F., Wei, L., Zhang, J., Tan, W., Chen, Y., et al. (2018) Preparation and characterization of quaternized chitosan derivatives and assessment of their antioxidant activity, *Molecules*, **23**, 516, doi: 10.3390/molecules23030516.
- Ильина А. В., Варламов В. П. (2016) Нейтрализация активных форм кислорода хитозаном и его производными *in vitro/in vivo*, *Прикладная биохимия и микробиология*, **52**, 5–20, doi: 10.7868/S0555109916010062.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., and Tsai, H.-L. (2002) Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid, *Food Chem.*, **79**, 307–313, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00145-0.
- Yilmaz, Y., and Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 255–260, doi: 10.1021/jf030117h.
- Fernandes-Negreiros, M. M., Batista, L. A. N. C., Viana, R. L. S., Sabry, D. A., Paiva, A. A. O., et al. (2020) Gallic acid-Laminarin conjugate is a better antioxidant than sulfated or carboxylated laminarin, *Antioxidants*, **9**, 1192, doi: 10.3390/antiox9121192.
- Xie, M., Hu, B., Wang, Y., and Zeng, X. (2014) Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 9128–9136, doi: 10.1021/jf503207s.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., and Hemantaranjan, A. (2019) Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **25**, 313–326, doi: 10.1007/s12298-018-0633-1.
- Zipfel, C. (2014) Plant pattern-recognition receptors, *Trends Immunol.*, **35**, 345–351, doi: 10.1016/j.it.2014.05.004.

15. Ye, W., Munemasa, S., Shinya, T., Wu, W., Ma, T., et al. (2020) Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 20932-20942, doi: 10.1073/pnas.1922319117.
16. Pasanphan, W., and Chirachanchai, S. (2008) Conjugation of gallic acid onto chitosan: an approach for green and water-based antioxidant, *Carbohydr. Polym.*, **72**, 169-177, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.08.002.
17. Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **65**, 45-80, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
18. Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., and Kang, D. (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, *Mol. Cells*, **29**, 539-549, doi: 10.1007/s10059-010-0082-3.
19. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 227-231, doi: 10.1021/tx00026a012.
20. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., and Frennesson, C. I. (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, **428**, 183-190, doi: 10.1042/BJ20100208.
21. Samuilov, V. D., Lagunova, E. M., Kiselevsky, D. B., Dzyubinskaya, E. V., Makarova, Y. V., et al. (2003) Participation of chloroplasts in plant apoptosis, *Biosci. Rep.*, **23**, 103-117, doi: 10.1023/a:1025576307912.
22. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., et al. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry*, **13**, 795-808, doi: 10.1002/cyto.990130802.
23. Yamazaki, I., and Yokota, K. (1973) Oxidation states of peroxidase, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 39-52, doi: 10.1007/BF01738677.
24. Brooks, J. L. (1983) Stimulation of peroxidase reactions by hydroxamates, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **116**, 916-921, doi: 10.1016/s0006-291x(83)80229-0.
25. Hauser, M. J. B., and Olsen, L. F. (1998) The role of naturally occurring phenols in inducing oscillations in the peroxidase-oxidase reaction, *Biochemistry*, **37**, 2458-2469, doi: 10.1021/bi972424k.
26. Самуилов В. Д., Киселевский Д. Б. (2016) Салицилгидроксамат усиливает НАДН-оксидазную активность пероксидазы в суспензиях митохондрий и хлоропластов гороха, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **1**, 23-28, doi: 10.3103/S0096392516010089.
27. Lee-Ruff, E. (1977) The organic chemistry of superoxide, *Chem. Soc. Rev.*, **6**, 195-214, doi: 10.1039/CS9770600195.
28. Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., and Pont-Lezica, R. F. (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics, *Trends Plant Sci.*, **11**, 33-39, doi: 10.1016/j.tplants.2005.11.006.
29. Liu, Y., Ma, L., Cao, D., Gong, Z., Fan, J., et al. (2021) Investigation of cell wall proteins of *C. sinensis* leaves by combining cell wall proteomics and N-glycoproteomics, *BMC Plant Biol.*, **21**, 384, doi: 10.1186/s12870-021-03166-4.
30. Goldberg, B., and Stern, A. (1976) Production of superoxide anion during the oxidation of hemoglobin by menadione, *Biochim. Biophys. Acta*, **437**, 628-632, doi: 10.1016/0304-4165(76)90029-5.
31. Rosen, G. M., and Freeman, B. A. (1984) Detection of superoxide generated by endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7269-7273, doi: 10.1073/pnas.81.23.7269.
32. Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., Sinitsyn, S. V., Shestak, A. A., Lagunova, E. M., et al. (2006) H₂O₂ intensifies CN⁻-induced apoptosis in pea leaves, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 384-394, doi: 10.1134/s0006297906040067.
33. Moore, A. L., and Siedow, J. N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 121-140, doi: 10.1016/s0005-2728(05)80197-5.
34. Popov, V. N., Simonian, R. A., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria, *FEBS Lett.*, **415**, 87-90, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01099-5.
35. Maxwell, D. P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8271-8276, doi: 10.1073/pnas.96.14.8271.
36. Киселевский Д. Б., Самуилов В. Д. (2019) Проницаемость плазматической мембраны для йодида пропидия и разрушение ядер клеток в эпидермисе листьев гороха: действие полиэлектrolитов и детергентов, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **74**, 188-194, doi: 10.3103/S0096392519030052.
37. Киселевский Д. Б., Шагдарова Б. Ц., Варламов В. П., Самуилова О. В., Самуилов В. Д. (2021) Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **76**, 18-23, doi: 10.3103/S0096392521010016.
38. Deeble, D. J., Parson, B. J., Phillips, G. O., Schuchmann, H.-P., and von Sonntag, C. (1988) Superoxide radical reactions in aqueous solutions of pyrogallol and n-propyl gallate: the involvement of phenoxyl radicals. A pulse radiolysis study, *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 179-193.
39. Reddan, J. R., Giblin, F. J., Sevilla, M., Padgaonkar, V., Dziedzic, D. C., et al. (2003) Propyl gallate is a superoxide dismutase mimic and protects cultured lens epithelial cells from H₂O₂ insult, *Exp. Eye Res.*, **76**, 49-59, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00256-7.
40. Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., et al. (2009) Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5933-5938, doi: 10.1021/jf900778u.
41. Pasanphan, W., Buettner, G. R., and Chirachanchai, S. (2010) Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study, *Carbohydr. Res.*, **345**, 132-140, doi: 10.1016/j.carres.2009.09.038.
42. Ren, J., Li, Q., Dong, F., Feng, Y., and Guo, Z. (2013) Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: synthesis and antioxidant properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **53**, 77-81, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.011.
43. Hu, Q., Wang, T., Zhou, M., Xue, J., and Luo, Y. (2016) *In vitro* antioxidant-activity evaluation of gallic-acid-grafted chitosan conjugate synthesized by free-radical-induced grafting method, *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 5893-5900, doi: 10.1021/acs.jafc.6b02255.
44. Wang, Y., Xie, M., Ma, G., Fang, Y., Yang, W., et al. (2019) The antioxidant and antimicrobial activities of different phenolic acids grafted onto chitosan, *Carbohydr. Polym.*, **225**, 115238, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115238.
45. Bai, R., Yong, H., Zhang, X., Liu, J., and Liu, J. (2020) Structural characterization and protective effect of gallic acid grafted O-carboxymethyl chitosan against hydrogen peroxide-induced oxidative damage, *Int. J. Biol. Macromol.*, **143**, 49-59, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.037.

**INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES
OF THE QUATERNIZED CHITOSAN MODIFIED
WITH A GALLIC ACID RESIDUE USING A PEROXIDASE
THAT PRODUCES REACTIVE OXYGEN SPECIES**

D. B. Kiselevsky^{1*}, A. V. Il'ina², A. P. Lunkov², V. P. Varlamov², and V. D. Samuilov¹

¹ *Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; E-mail: dkiselevs@mail.ru*

² *Laboratory of Biopolymer Engineering, Skryabin Institute of Bioengineering,
Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

Chitosan modified with a (2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl group and a gallic acid residue, or quaternized chitosan with gallic acid (QCG), was synthesized. Its antioxidant properties have been investigated. Peroxidase in combination with NADH and salicylhydroxamate (SHAM) caused the consumption of oxygen and the formation of H₂O₂ in an aqueous solution as a result of O₂ reduction in peroxidase-oxidase reactions. QCG reduced the rates of O₂ consumption and H₂O₂ generation. The antioxidant propyl gallate (PG) and superoxide dismutase (SOD) had the same effect, but not quaternized chitosan (QC) without gallic acid. The effect of chitosan derivatives on the production of reactive oxygen species (ROS) in cells of the epidermis from pea leaves and on their death, which was detected by the destruction of cell nuclei, was investigated. QCG, QC, and SOD had no effect, while PG reduced the rate of ROS generation in cells of the epidermis, which was caused by NADH with SHAM or by menadione. QCG and QC prevented the destruction of guard cell nuclei in the epidermis from pea leaves that was caused by NADH with SHAM or by KCN. SOD had no effect on the destruction of nuclei, while the effect of PG depended on the inducer of cell death. The suppression of destruction of the nuclei of guard cells by chitosan derivatives is associated not with their antioxidant effect, but with the disruption of the plasma membrane of the cells. The results obtained indicate that QCG exhibits antioxidant properties in solutions, but does not prevent the formation of ROS in plant cells. The mechanism of its antioxidant action is similar to that of PG and SOD.

Keywords: chitosan, quaternized chitosan, peroxidase, superoxide dismutase, reactive oxygen species, propyl gallate

УДК 576.311; 571.27

НАСКОЛЬКО ОБОСНОВАНЫ ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ О ЗАПРОГРАММИРОВАННОМ СТАРЕНИИ В ТЕОРИЯХ ВЕЙСМАНА?

Обзор

© 2022 P. R. Winterhalter*, A. Simm

Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany; e-mail: winterhalter.patrick@gmail.com

Поступила в редакцию 02.10.2021

После доработки 30.11.2021

Принята к публикации 15.12.2021

Теории о преимуществах смерти и связанной с этим повышенной вероятности запрограммированного старения противоречивы, и их поддерживает лишь меньшинство. Обоснованность этих предположений необходимо проанализировать. С этой целью в данном обзоре рассмотрены различные подходы к обоснованию полезности существующих гипотез и источники их возникновения, обращая внимание на возможные преимущества быстрой смены поколений, вызванной совместным действием различных эволюционных факторов. Были рассмотрены взгляды отца теорий о регулируемом старении – Вейсмана, который в конце своей карьеры придерживался взглядов неадаптивной эволюции. Циркадные ритмы обсуждаются в теоретическом эксперименте, как возможный молекулярный источник регуляции старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Август Вейсман, теория старения, запрограммированное старение, семелпарность, MASON-модель, циркадные ритмы, часовые гены.

DOI: 10.31857/S0320972522010092

ВВЕДЕНИЕ. ЗАПРОГРАММИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ КАК ВЗГЛЯД МЕНЬШИНСТВА

Предполагается, что четыре незапрограммированных эффекта вносят основной вклад в старение. Накопление повреждений, таких как мутации/разрывы ДНК или агрегация/модификация белков, а также износ биологических структур считаются наиболее важными [1]. Более широко распространены дезадаптации, такие как антагонистическая плеiotропия, адаптация к ограничениям, вызывающим решение инвестировать либо в потомство, либо в продление жизни, а также гемодинамическая дисрегуляция, приводящая к разрушению регуляторных сетей [1]. Господствующее мнение о том, что старение само по себе не приносит пользы и, следовательно, не запрограммировано генетически [2], является часто возникающим впечатлением. Это оправдано идеей, что отбор может происходить только при наличии различия фенотипа, приводящего к различию репродуктивного успеха [3]. Удивительно, но опрос в рамках сообщества исследователей старения показал,

что нет чёткой тенденции к консенсусу во мнениях (<65% с одной или другой стороны), является ли старение генетически запрограммированным, а не просто побочным продуктом несовершенства или эволюционных ограничений [1]. Было ясно, что разногласия по вопросу, является ли старение запрограммированным или нет, отражают, скорее, расхождения во мнениях, чем в определениях [1]. Незапрограммированные эффекты предоставляют множество разных сценариев старения, что делает выявление основного игрока непростой задачей. Гораздо более вероятно, что все маркёры вносят определённый вклад, зависящий от генетики и индивидуального воздействия окружающей среды. Такой же плавный переход, скорее всего, существует и для проблемы старения, является ли оно запрограммированным или нет; реальная ситуация, скорее всего, зависит от потребностей вида. Разнообразие стратегий репродукции подсказывает нам это направление.

ПОЯВЛЕНИЕ ТЕОРИЙ ЗАПРОГРАММИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ

Семелпарность (гибель после репродукции) — это явление, известное для нескольких классов растений и животных. Двухлетние рас-

Принятые сокращения: ЦР — циркадные ритмы; EGT — эволюционная теория игр; HDAC — гистаоцетила-трансфераза; RQH — гипотеза Красной Королевы.

* Адресат для корреспонденции.

тения представляют собой прекрасный пример: они выживают в условиях холодной зимы в своём ареале, но умирают в последующем сезоне, скорее всего, в результате запрограммированного жизненного цикла. Существует множество теорий, объясняющие возникновение однократной репродукции [4]. Обоснования сезонной смертности, наблюдаемой для самцов некоторых видов сумчатых, несколько раз претерпели изменения. Сначала считалось, что такая сезонная смертность происходит из-за невозможности накопить достаточные жировые отложения для сезонов дефицита продуктов питания, затем последовала идея, что такая смертность является результатом рудиментарной неадаптивной тенденции в этой группе — побочный продукт преимущественного использования белковых запасов [5]. Эта концепция была опровергнута идеей о том, что смертность самок может быть причиной семелпарности самцов [6]. Осознание того, что быстрая смена поколений предоставляет преимущества, не имеет смысла даже упоминать для такого стиля жизни или можно избежать упоминания этого целенаправленно, поскольку это может способствовать концепции запрограммированной смерти.

Сокращение продолжительности жизни должно привести к уменьшению числа потомков, что является сильным аргументом против идеи о индуцировании смерти. Действительно, высокая репродуктивность очень полезна, но не всегда является самой успешной стратегией. Однако Леопольд упомянул в 1961 г., что у многих растений старение имеет различное и положительное значение с точки зрения экологической адаптации, естественного отбора и эффективности внутренней физиологии [7]. Для случая естественного отбора он также написал, что долгая продолжительность жизни многолетних растений обеспечивает защиту от быстрых эволюционных изменений. Если бы существовали виды растений, которые не старели и были бы почти бессмертны, изначальная популяция продолжалась бы бесконечно, воспроизводя исходный геном, и поэтому эволюционная способность этого вида к адаптации к изменениям в окружающей среде была бы минимальна. Леопольд утверждал, что способность растений стареть является катализатором эволюционной адаптации [7]. Голдсмит детально рассмотрел проблему уменьшения геномного разнообразия в свете способности эволюционного развития [8–12]. Он предположил, что более быстрая смена поколений должна ускорять эволюцию, так как больше положительных изменений может произойти в группе с укороченной продолжительностью жизни [13, 14]. Это преимущество кажется очевид-

ным и неудивительным, если бы оно было упомянуто раньше. Голдсмит отметил далее, что в этом случае больше генетических вариантов вида может возникнуть в течение того же самого периода времени [14]. В дополнение к ограниченному числу вариантов, возникающих в результате идентичной репродукции, Леопольд отметил преимущества смерти в способности к распространению. Он написал, что, если благоприятные генетические изменения происходят в однолетних сорняках, распространение этих изменений внутри популяции происходит с максимальной скоростью, так как полный оборот размножающейся популяции происходит каждый год [7]. Эта концепция о более быстром распространении полезного признака в уже установившемся ареале обитания была далее развита математически Либертини, основываясь на теории смерти, ускоренной старением [15]. Затем Скулачёв представил молекулярно-биологические преимущества смерти, описывая полезность такого строго регулируемого процесса уничтожения, как апоптоз для предотвращения аутоиммунитета, поддержки морфологических изменений или для удаления опасных клеток [16]. В этом случае преимущество смерти на благо вида было названо фенотопозом, и были предложены три мишени механизмов старения: теломеры и теломераза, индукция белков теплового шока и активные формы кислорода (АФК). В дополнение к семелпарности, острый фенотопоз включает, например, апоптоз у бактерий, индуцированный фагами, или септический шок у животных. Согласно Скулачёву, оба эти процесса являются реакцией живого организма, направленной на остановку распространения патогена, которая защищает всю популяцию [17]. Напротив, предполагаемый пожизненный медленный фенотопоз встречается у всех организмов и, предположительно, связан с изменённой скоростью реакции активных форм кислорода в митохондриях [18, 19]. Несколько позже Либертини тоже предложил возможный механизм регулируемого старения. В этой связи необходимо напомнить, что во всех клетках (за исключением эмбриональных и опухолевых) число удвоений напрямую связано с укорочением теломер. Таким образом, была выдвинута гипотеза, согласно которой теломеры защищены кэпом ДНК-белкового комплекса и становятся уязвимыми для репликативного старения только в неэкспрессированном состоянии. В этом случае период времени, когда теломера остаётся незащищённой, кажется пропорциональным укорачиванию [20]. Была предложена гипотеза, что регуляция, зависящая от длины теломер, контролирует способность кэпа взаимодействовать с теломерами. Либертини предположил, что субтело-

мерные регуляторные последовательности и их транскрипция, уменьшающаяся с возрастом, изменяют покрытие теломер и приводят к клеточным изменениям, имеющим решающее значение для симптомов старения, с особым акцентом на последовательности TERRA [21, 22].

Однако Скулачёв первоначально ссылаясь на предположения Вейсмана [16], выдвинутые около 140 лет назад, где смерть в условиях постоянно ограниченных ресурсов окружающей среды рассматривалась как неизбежность, потому что старые и, следовательно, изношенные особи бесполезны и даже опасны, так как занимают место и используют ресурсы более молодых и лучших особей (стр. 30–31) [23]. Точно не указано, что для Вейсмана означает «лучше»: более жизненно или более приспособленно? Однако из-за обилия контекста и примеров кажется очевидным, что освободившееся место выгодно для потомков, и это ускоряет адаптацию популяции к окружающей среде [23]. В своих поздних произведениях Вейсман приводит конкретный пример конъюгации инфузорий, указывая, что смешение видов незаменимо для развития вида, и что смерть необходима для искоренения несмешивающихся организмов (стр. 150) [24]. Вейсман не знал о разнице между спариванием и конъюгацией и определял все типы взаимодействий, сопровождающиеся соединением наследственной информации двух организмов, как амфимиксия. Он уточнял, что индивидуальная изменчивость составляет основу теории отбора (стр. 21), и что смешение признаков делает возможной эту индивидуальную изменчивость, которая отвечает за образование новых видов путём отбора (стр. 29) [25].

Следовательно, он рассматривал смерть, как преимущество, позволяющее избежать эволюционного застоя путём остановки или ограничения вариаций. Предположения, выдвинутые Вейсманом, убедили его в существовании оптимальной продолжительности жизни, и он проповедовал внутреннюю регуляцию жизни, сравнимую с другими приспособлениями, такими как размер тела (стр. 8–9, 41) [23]. изнашивание биологических структур (тела) не принималось в качестве ограничивающего возраст фактора. Вместо этого он постулировал внутренне ограниченный потенциал пролиферации (стр. 27–28, 86–90), основываясь на наблюдениях за эмбриогенезом (стр. 39–40), доказанных Хейфликом ~80 лет спустя.

Вейсман был первым учёным, который пытался объяснить полезность смерти в эволюционном аспекте и продвигал в начале своей карьеры концепт, известный сейчас как запрограммированное или регулируемое старение.

КОНТРОВЕРСИЯ ГРУППОВОГО ОТБОРА

Возможно, наиболее существенная причина отказа от идеи запрограммированного старения в настоящее время основана на представлении о том, что индивидуальный отбор является гораздо более эффективным, чем отбор на уровне групп [2]. Вскоре после объявления предпочтения индивидуального отбора, поддержанного Smith [26], была предложена модель с похожими математическими допущениями, в которой альтруистическое поведение имеет преимущество перед личной приспособленностью, не нарушая концепции индивидуального отбора [27]. В модели были использованы гетерогенность популяции, изоляция, отбор и смешение, что привело к постепенному увеличению числа альтруистов. Такая модель, основанная на изоляции и неравномерном распределении субтипов в популяции, по-видимому, отражает естественную ситуацию гораздо лучше, чем одна большая гомогенная популяция. Далее спорно обсуждается, основано ли альтруистическое поведение больше на родственном отборе чем на групповом? Однако групповой отбор может осуществляться через распространение преимуществ родственного отбора внутри вида. Гамильтон предложил первые математические модели о требуемой степени родства для родственного отбора уже в 1964 г. [28]. По-видимому, существует также плавный переход между типами отбора (индивидуальный, родственный, групповой). Примером могут служить виды бактерий, потому что большинство из них образуют биоплёнки, которые часто бывают либо моноклональной либо близкородственной природы. Таким образом, родственный отбор может превратиться в групповой отбор при определённых условиях, как, например, катастрофическое событие [21]. Кроме того, точные модели структуры популяции с допущением стандартной теории естественного отбора могут быть более простым и лучшим подходом, который также может объяснить групповой отбор [29].

Однако предположим, что существует естественный отбор на уровне выше индивидуального. В этом случае ситуация может заключаться в установлении равновесия между благоприятными и неблагоприятными факторами в группе.

Существует несколько примеров, когда природа может поощрять подчинение индивидуальных интересов групповым. Предупреждающая окраска — это наиболее яркий пример, когда индивидуальные интересы подавляются жертвованием на благо вида, включая их собственное потомство. Неясно, как такое явление могло возникнуть, когда разнообразие окрасок может ле-

жать в основе [30]. Кроме того, в отличие от других мигрирующих животных, некоторые лососи перестают есть, когда попадают в пресную воду для спаривания, даже если они теряют массу энергии каждый день без пищи [31]. Это парадоксальное явление может принести пользу для всего вида, потому что в противном случае вся река будет вычищена массовым наплывом хищников. Индивидуум, вероятно, выиграет от еды, в то время как вид пострадает, так как потомство прошлых лет и их пища будут съедены. По сравнению с примером подчинения рабочих медоносных пчел-яйцекладок аргумент родственного отбора кажется неоправданным для лососей, так как особи чаще всего не являются близкими родственниками. Однако пример трутвовок представляет собой ещё один пример, когда отрицательные последствия для группы будут замаскированы, так как последующее поколение будет ослаблено чрезмерным эгоистическим поведением и поэтому уменьшит своё социальное поведение. Обычно проблема решается через принуждение к стерильности и охраной [32]. Это показывает, что социальные группы могут защищать себя от разрушающего эгоистического поведения, что может быть примером того, как могут возникнуть механизмы, предотвращающие поведение индивидуальных особей, неблагоприятное для группы, даже если проблема, провоцирующая это поведение, находится не на первом плане эволюционного отбора. Надзирательство, такое, как поедание неоплодотворённых яиц, вероятнее всего, предопределяется генетически, и потеря его приводит к долгосрочным негативным последствиям. Эти сообщества выживут лучше, если им удастся прочно встроить полицейское поведение в свою генетику, или, ещё лучше, если такое поведение будет связано с жизненно-необходимыми процессами. Описанные типы поведения кажутся легко разрушаемыми преимуществами для индивидуальных особей, но каким-то образом они остаются, что может быть объяснено наличием отбора более высокого уровня. Наконец, половое размножение само является, скорее всего, наиболее распространённой формой групповой селекции, так как оно, как кажется, больше связано с опасностями и ущербом для особи, но преимуществами для вида.

Признаки, которые выгодны для индивидуального организма, но не выгодны для группы, скорее всего, приведут к уменьшению популяции в этом конкретном регионе. Этот эгоистический признак должен превалировать над неэгоистическими признаками в других группах с большей численностью популяции, согласно уже упомянутой математической модели, предложенной

отцом теории многоуровневого отбора [27]. В этом случае гены эгоистического поведения разбавятся со временем, особенно если принимается более распространённая модель полигенетического промежуточного наследования, а не доминантного. В этом случае, скорее всего, установится равновесие (Nash), вероятно, зависящее от степени изоляции, гетерогенности субгруппы и степени невыгодности эгоизма для группы.

Отказ от пищи или от потомства, по-видимому, также противоречит личным интересам. Нет сомнения в том, что в этом случае часто ожидается компенсация, как, например, требование вернуть обратно ресурсы, что наблюдается среди вампировых летучих мышей [33]. Для многих организмов, живущих в группах, наблюдается такая кооперация, когда особи должны подавить свои эгоистические желания, чтобы поддержать другого члена группы, который может помочь им в будущем, что делает родственные/групповые связи сильнее. В этом случае успех поведения одной особи зависит от поведения других членов группы. Определение альтруизма не совсем подходит во многих таких случаях. Похоже, он основан на другой форме эгоизма, которую можно было бы назвать «соучастием», и можно рассматривать как дополнительный тип преимущества более высокого уровня.

В целом соучастие, такое как внутривидовая защита (предупреждающий сигнал или окраска, групповая защита, синхронное спаривание) кажется достаточно сильным фактором, чтобы востребовать, даже в случае, когда такое поведение может негативно отразиться на интересах особи.

РАЗНООБРАЗИЕ РАЗЛИЧИЙ И ИХ НАСЛЕДОВАНИЕ

Необходимо отметить, что Голдсмит различал групповой отбор и концепт эволюционности, который, согласно его взглядам, создаёт условия (вариации), которые должны существовать прежде, чем отбор начинается [14]. Он приводит такой пример. Можно считать, что средний рост индивидуума (здесь можно использовать любую другую характеристику) оптимален с точки зрения приспособленности. Следовательно, все животные, которые ниже или выше среднего, менее приспособлены. Поэтому особи в популяции, состоящей из клонов среднего животного, будут более приспособлены, чем большинство в популяциях с большими различиями. Таким образом, изменчивость способствует развитию, но снижает приспособленность.

Для эволюции скорость изменчивости, по-видимому, очень важный параметр, поэтому

классификация необходима. Существует скорость внутренней изменчивости, связанная с видом, которая зависит от таких факторов, как скорость мутаций или внутригеномный обмен. Обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека имеет необычайно высокую частоту ошибок копирования нуклеотидов (1/1700), что считается причиной высокой генетической вариативности этого вируса [34]. Высокая частота мутаций является одной из причин, по которой атака иммунной системы и лечение не дают результатов, что является явным преимуществом выживания вируса. Ещё более высокая частота мутаций привела бы ко многим ошибкам, которые, вероятно, могли бы привести к нефункциональному организму. Оптимальная скорость внутренней изменчивости, по-видимому, регулируется классическим индивидуальным отбором идеала. Такие генетические вариации всегда отражаются на всей цепи взаимодействий, в результате возникает целая череда последствий, которая всегда более или менее многофакторная. Однако единичные гены очень редко ответственны за существенные изменения и фенотип организма. Скорее всего, изменения вызываются сложной комбинацией различных генетических

вариантов, что было понятно Вейсману (рис. 1), и изменениями их регуляции.

Скорость комбинативной изменчивости за счёт полигенного наследования, обеспечиваемая объёмом и доступностью геномного обмена при скрещивании (или через плазмиды), является эффективным способом приобретения разнообразия. Разнообразие обмениваемого геномного материала зависит от гетерогенности, количества и присутствующего разнообразия различий в группе. Многие из этих параметров зависят от окружающей среды и также могут косвенно зависеть от вида организма и его характеристик, таких как повышенная мобильность, групповое спаривание или выбор партнёра. Скорость обмена или рекомбинации, по-видимому, снова зависит от индивидуального отбора. Однако группа должна решить, предпочитает ли она комбинативные вариации однополому размножению.

Внутренние и комбинативные различия приводят к разнообразию в генофонде, что является очень полезной предпосылкой для эволюции, в то время как тенденция к изменениям, вероятно, ориентирована в сторону интересов вида. Неясно, необходимы ли уже существующие различия для целей селекции без корректировки, учитывающей потребности вида. Поэтому вариации, скорее всего, не могут сами по себе обеспечить отбор более высокого уровня. Ответ на вопрос о том, является ли смена поколений, ответственная за постоянное образование вариаций, существенным фактором (прямым или косвенным) для естественного отбора на уровне выше индивидуального, может быть ключевым. Поколение с гетерогенными вариациями и выгоды смены поколений должны вносить вклад в способность организма адаптироваться, в то время как уменьшение количества вариаций должно негативно отражаться на группе.

Существуют ли примеры в природе, когда ослабленная адаптивность приводит к разрушительным последствиям для всего вида? Такие примеры могут подсказать, что случится, если изменится регулирование процесса смены поколений. С этой точки зрения дальнейшие исследования в области репродукции необходимы.

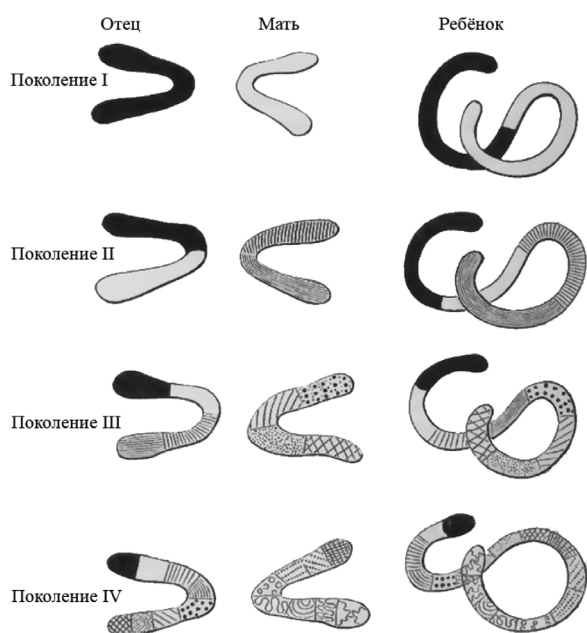


Рис. 1. Изменения наследуемых характеристик в каждом поколении, согласно Вейсману (стр. 32) [35]. Вейсман делает вывод, что при передаче родительского наследуемого вещества его количество должно уменьшаться вдвое. В противном случае количество генетического материала будет удваиваться с каждым поколением. Это уменьшение никогда не происходит одинаково. Поэтому создаются новые комбинации наследуемого вещества, что приводит к разнообразию признаков среди детей и индивидуальным различиям (стр. 67–75)

ДЕФЕКТЫ ЭВОЛЮЦИИ

Истинный партеногенез путём однополого размножения обнаружен примерно в 90 видах позвоночных [36] и, по-видимому, является достойным упоминания примером ослабленной адаптивной способности. Небольшое количество видов по сравнению со всем семейством поз-

воночных говорит от том, что половое размножение более предпочтительно эволюционно. Это вызывает гендерный парадокс, поскольку партеногенез имеет такие преимущества, как отсутствие двойных затрат на самцов, не рожающих детей, и всех трудностей при спаривании или поиске партнёра. Smith [37] показал математически, что существование пола не является предпочтительным для эволюции из-за существенной неэффективности по сравнению с бесполом размножением.

Почему же тогда спаривание существует? Уильямс первым ответил на этот вопрос в 1975 г., сравнив бесполое размножение с копией лотерейного билета. В отличие от этого, спаривание производит несколько новых комбинаций цифр в лотерейном билете, что увеличивает вероятность выиграть эволюционный джекпот [38]. Эволюционный биолог Белл показал в своей работе в 1982 г., что бесполое размножение наблюдается реже в больших комфортабельных ареалах обитания, но в основном встречалось в небольших, более экстремальных, где экологическое пространство необходимо быстро и чаще заселять [38]. Ранее считалось, что половое размножение необходимо для адаптации к сложным условиям обитания. Белл пришёл к выводу, что пол и, следовательно, более высокая степень генетической изменчивости необходимы для преобладания на больших стабильных территориях, которые часто уже заселены и довольно сложны. Он считал, что пол используется во внутривидовой конкуренции, но также упомянул сходство с гипотезой Красной Королевы (RQH), предложенной в 1973 г. Van Valen [38]. У нескольких авторов были параллельные ассоциации пола и RQH [39–41], что в настоящее время является наиболее общепринятым объяснением развития полового размножения. RQH описывает ситуацию, когда продолжающаяся эволюция необходима, чтобы выжить в постоянной межвидовой конкуренции, такой как взаимоотношения между паразитом и хозяином или хищником и жертвой. Следует отметить сходство между аргументами Вейсмана, Белла и Голдсмита, указывающими, что генетическое разнообразие — это движущая сила эволюции. Также интересен факт, что Вейсман уже показал преимущества бесполого размножения в ареалах обитания с быстроменяющимися экстремальными условиями (стр. 167–168) [24], а далее описал половое размножение как неоценимое преимущество для приспособляемости видов (стр. 55) [25]. Следовательно, его можно рассматривать как пионера идеи RQH, поскольку его аргументы основаны на преимуществах смешения, не ограничивая себя межвидовой конкуренцией.

Лайвли экспериментально поддержал идею RQH, наблюдая более высокую паразитарную инвазию у однополых рыб (*Poeciliopsis*) по сравнению с двуполыми аналогами [42]. Эта клональная гибридогенная рыба существует более чем 100 000 поколений [43]. Старейшая известная однополая линия отделилась от своего двуполого позвоночного родственника (*Ambystoma barbouri*) примерно 5 млн лет назад [36]. Эта саламандра создаёт много генетических вариаций из-за сложных межгеномных обменов и через включение чужого генетического материала (спермы) от двуполых особей [36], что могло быть необходимо, чтобы избежать вымирания. Тем не менее остаётся вопрос: является ли это все-таки истинным партеногенезом, и не являются ли 5 млн лет просто мигмом в истории эволюции?

Клональное размножение у позвоночных является, по-видимому, примером того, как нарушение адаптивной способности может привести к видovому отбору. Он не направлен на выявление того, оказывает ли и какой эффект (генетическая изменчивость, смена поколений или распространение выгод) наибольшее влияние. Тем не менее очевидно, что дефекты эволюции могут привести к тупиковому концу. В любом случае либо истинный партеногенез у позвоночных должен найти обратный путь к половому размножению, расширить генетическое разнообразие (как в случае *Ambystoma barbouri*), либо вымирание неизбежно. Любопытно, что Либертини тоже исследовал сходства между полом и старением и отнёс оба эти явления к фенотипу [44]. Он показал слабость теории RQH математически и возродил старейшую классическую идею о преимуществах полового размножения — гипотезу Фишера–Мюллера. Интересно, что в ограниченной популяции снижение полового преимущества задерживается введением третьего полезного гена. Многие полезные гены, которые могут увеличить выгоды этого классического предположения, могут быть вовлечены в процесс смены поколений в результате плейотропного наследования. Основная идея преимущества может быть частично связана с Вейсманом, согласно которому амфимиксис обеспечивает непрерывную рекомбинацию характеристик, полезных для групповой эволюции [24, 25].

ВОЗМОЖНЫЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ

Однополое размножение сужает диапазон различий в группе, что непросто восстановить, так как для этого требуются особые условия и,

скорее всего, много времени. Однако старение и его потенциальные преимущества не так просто определить. Признаки старения тоже подвергаются нормальному распределению, что затрудняет объяснение того, почему незначительные изменения средней продолжительности жизни могут иметь преимущества для группы. Экспериментально было бы сложно проверить, имеют ли субпопуляции с пожилыми людьми повышенную скорость вымирания.

Ускоренная смена поколений, связанная с освобождением места для более быстрого распространения и большим количеством генетических вариантов, возникающих за определённый промежуток времени, может дать лучшее объяснение преимуществ старения. Несмотря на то что трудно определить вклад каждого эффекта, можно считать, что, скорее всего, они действуют синергетически. Однако более быстрое распространение полезных признаков благодаря генетическому обмену, такое как половое размножение, может происходить только, если занятое место освобождается. Либертини обсуждал распространение преимуществ полезных признаков, которые могут произвести наиболее значимый эффект [15, 44]. Тем не менее выгоды последовательных улучшений для короткоживущих организмов необходимо обсудить детально, потому что это практически нигде не обсуждалось в математических терминах. В связи с этим масштаб таких преимуществ может быть до сих пор недооценён. Весьма вероятно, что эволюционный процесс не происходит линейно во времени, что было бы выгодно эволюции. Приобретённые признаки должны умножаться синергично, напоминая процесс, подчиняющийся закону сложных процентов, в котором существенный экспоненциальный рост наблюдается только через несколько поколений.

Адаптация, зависящая от поколения [f_g], должна определяться *средним по популяции значением предоставленного преимущества на каждое поколение в процентах* [η] и *числом поколений* [g] как показателя степени. Чтобы понять влияние изменения на старение, эти вычисления должны быть расширены включением *изменяющейся скорости смены поколений в процентах* [Δg] до окончательного *зависящего от поколения адаптационного изменения* [$f_{g,\Delta g}$]; $f_{g,\Delta g} = (1 + \eta)^{g^* \Delta g} - 1$. Количество возможных полезных относительных различий (*относительную изменчивость*) [θ] включает внутренние и совокупные различия, и они должны быть учтены в η вместе с преимуществами распространения (в согласии с идеями Либертини). В результате этого θ сильно зависит от способа размножения. Эта величина

увеличивается значительно для случая полового размножения, приводя к существенным выгодам старения для двуполых организмов по сравнению с однополыми. Более быстрая смена поколений создаёт больше вариаций во времени. Следовательно, η надо разделить на $(1 - \Delta g)$; $f_{g,\Delta g} = (1 + \eta / (1 - \Delta g))^{g^* \Delta g} - 1$. При вычислениях выгод смены поколений для популяции необходимо учитывать её размер и распределение вариаций.

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ДЛЯ СОКРАЩЕНИЯ ЖИЗНИ

В мире, где распределение в каждой группе несовершенно, субпопуляции обитают в более или менее изолированных ареалах и имеют некоторые различия, такие как средняя продолжительность жизни. Это происходит потому, что эволюция обычно концентрируется на одних признаках, в то время как другие побочные характеристики остаются несовершенными. Старение может проявиться в популяции как побочный эффект более выгодной адаптации или генетического дрейфа. Эффект разделения был установлен на высокоинбредных линиях мышей, где дрейф генов практически исключён. Тем не менее это не предотвращает генетические изменения, за которыми следуют существенные изменения фенотипа [45]. Если преждевременная смерть происходит из-за адаптивных или неадаптивных причин, таких как predisposition к раку или инфаркту, субпопуляция с более короткой продолжительностью жизни должна будет эволюционировать быстрее и, следовательно, будет доминировать в группе как более адаптированная. Скорее всего, это может произойти через несколько этапов разделения, смешения и отбора, как описано для развития предупредительного крика [27]. Можно ли рассматривать в этом случае predisposition к болезням, как предпосылки запрограммированной смерти? Весьма вероятно, что такой непреднамеренный отбор привёл к различным причинам смерти, поскольку природе все равно, какой путь был выбран, если результат устраивает. Необходимо определить эти неадаптивные несовершенства, которые могут косвенно поддерживать старение/смерть.

То, что позже можно было бы считать полезной смертностью, могло быть вызвано окружающей средой по совершенно другой причине. Примером такой ситуации могут служить бархатцы (популярные декоративные растения), которые не выживают зимой в Центральной Европе и могут распространяться только семенами.

ми. Такая вынужденная «однолетность» может проявиться генетически со временем.

RQH даёт ещё одно объяснение того, почему старение могло эволюционировать. Далее старение было предложено как адаптационный механизм, который является результатом накопления повреждений, а не конкретной программой [46], что было основано на идее RQH с постоянной конкуренцией коэволюционирующих паразитов и хищников. Этот подход, по-видимому, основан на идее выгодного, но косвенного отбора. Также упоминалось, что старение могло возникнуть, чтобы ограничить распространение болезней [47]. Тем не менее RQH кажется наиболее разумным объяснением того, почему мог возникнуть адаптивный механизм старения. Эта гипотеза описывает потребность в высокой способности к адаптации и, следовательно, в большом количестве вариаций. Лайвли отметил, что в расчётах для отбора на половое размножение необходимы как распространенные, так и высоковирулентные инфекции [48–50], что ограничивает общую применимость RQH [51]. Он установил, какая может быть цена возникновения пола, если используется подход, принимающий во внимание дополнительные расходы для оценки потенциальных затрат на сокращение продолжительности жизни [51]. Оказалось, что необходимы нереально большие изменения/адаптации, чтобы объяснить возникновение пола в этих моделях. Две из этих моделей пытаются объяснить возникновение пола только одной эволюционной потребностью. Однако в дополнение к взаимоотношениям хозяин/паразит и хищник/жертва существуют и другие движущие силы адаптации многомерного характера, такие как разнообразная внутри- и межвидовая конкуренция за ресурсы (пища, пространство) и приспособление к окружающей среде. Только определенный процент адаптаций может быть необходим для конкретной цели межвидовой борьбы. Следует отметить, что симуляции, в которых смерть кажется полезной на основании сокращения жизни поколений [15, 52, 53], были отклонены на основании таких же аргументов о нереально быстро изменяющихся полезных мутациях и условиях окружающей среды [2].

Далее было отмечено, что частота спонтанных мутаций у *Drosophila* примерно одна на поколение [54], и из этого был сделан вывод, что количество полезных мутаций должно быть гораздо меньше. А мутации, вызывающие существенный положительный эффект, должны быть особенно редкими. Таким образом, чтобы достичь более реалистичных уровней мутаций, доля носителей должна быть настолько мала, что за-

программированное старение не может развиваться [2]. Следует добавить, что в процитированной статье Кейтли упомянуты два альтернативных расчёта с примерно втрое более высокими скоростями мутаций. Но более существенным фактором является то, что мутации — это только один источник генетической вариативности, помимо гомологичной рекомбинации, иммиграции, эмиграции или транслокации. И наиболее важным фактором, определяющим разнообразие организмов, является комбинация генов (полигены). Принимая это во внимание, можно заключить, что мутации вряд ли являются основными наследственными двигателями эволюции. Эта идея может быть поддержана долгосрочным эволюционным экспериментом, в котором мутации, по-видимому, подтверждают эволюционные шаги. Все же выгодное новшество появилось благодаря модуляции генома, когда дупликация гена транспортера цитрата сопровождалась дополнительной транслокацией правильно расположенного аэробного промотора [55]. Редкость таких явлений в большом геноме должна сопровождаться, помимо смены поколений, высокой частотой. В противном случае такая ситуация была бы маловероятной. Благодаря мейозу и всем последующим типам рекомбинаций такие необычные события более вероятны во время спаривания.

Кейтли также предполагает, что вредные мутации могут удаляться, потому что потомство с негативным воздействием не будет развиваться [54], что демонстрирует недооцененный природный фильтр. Почти 43% из более чем 50 000 рожавших женщин сообщили, по крайней мере, об одном самопроизвольном аборте в первом триместре [56], и при этом нет сообщений о проблемах с оплодотворением. Беременность — это довольно затратный и опасный процесс, и непригодные к жизни организмы, скорее всего, будут удалены на ранних стадиях процесса. Равного распределения между вредными и полезными признаками не следует ожидать, так как явно негативные будут заранее отобраны. Таким образом, частота мутаций не кажется подходящим инструментом для предположения о способности образовывать новые вариации в каждом поколении. Предполагается, что суммарное количество преимуществ может быть больше, особенно в случае полового размножения. Одной из таких выгод может быть то, что спаривание помогает удалять вредные мутации путём рекомбинации [57–59] — ещё одна гипотеза, которая может объяснить развитие полового размножения (гипотеза храповика Мюллера). Предотвращение проблемных генетических накоплений, таких как мутации, также может способ-

ствовать использованию преимуществ смены поколений. Однако другой аргумент, отрицающий идею выгоды смены поколений, указывает, что некоторые модели не подходят для полового размножения, так как половое размножение делает возможным возникновение поколения детей, которые объединяют нестаревший генотип одного родителя с обнаруженной полезной мутацией (мутациями) у другого родителя — потомство «мошенников» [2]. Этот аргумент подходит для симуляции межвидовой конкуренции и гомогенно распределённых агентов. Предположим, что старение (адаптивное или косвенное) может иметь большее значение в межвидовой конкуренции, что является наиболее разумным объяснением для развития полового размножения. В этом случае уже существующие модели с несмешивающимися компонентами должны подойти для выяснения полезности старения. Однако до сих пор модели не могут объяснить само появление старения.

СИМУЛЯЦИЯ СТАРЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛИ MASON

MASON — это регулярно используемая модель [60] для имитации эффектов изменённой продолжительности жизни, когда агенты сохраняются в двумерном мире, двигаясь, размножаясь и умирая [2]. Чтобы проверить предположения Голдсмита, воспроизводство агентов в MASON зависит от достижения возраста зрелости и от набора генов, которые могут иметь значения (аллели) в пределах от 0 до 1, которые вносят аддитивный вклад в вероятность воспроизведения (фертильность). Эволюция в этом случае направленная, так как фертильность имеет только положительное значение без всяких недостатков, таких как повышенное потребление энергии. Кроме того, в модель введён переключатель, утверждающий, что аллели, мало влияющие на фертильность, будут постепенно утеряны. Чтобы это предотвратить, направление отбора периодически переключается в противоположную сторону (т.е. в этом случае аллели с малыми значениями приводят к высокой фертильности). Необходимость переключателя для продолжения эволюции кажется неестественной для моделирования постоянного развития. Более гибкие и требовательные факторы могут понадобиться со своими затратами и преимуществами. Идея эволюционной теории игр (EGT) может больше подходить для таких симуляций. Агенты должны взаимодействовать друг с другом на разных уровнях в непрерывных циклах, наблюдать различные стратегии, которые влияют

на то, как определенные навыки отдельных фенотипов улучшаются или терпят неудачу с течением времени. Изменение приспособленности уникальных фенотипов, в свою очередь, влияет на частоту их встречаемости в популяции. *In silico* модели могут потребовать большей гибкости в разных конкурирующих стратегиях, чтобы обеспечить аутентичное поведение эволюции, и конкуренция может быть самым критическим компонентом, увеличивающим давление естественного отбора, которое двигает прогресс. В случае такого многомерного противостояния в симуляции агентам должно быть разрешено умирать, если их фенотип неконкурентоспособен по сравнению с развившимися потомками. *Независимой от возраста экологической смертности, связанной с окружающей средой* [7], может быть недостаточно для поддержки естественного количества новых фенотипов. В этой модели многие потомки не будут возобладать так же, как их родители, что не является проблемой, так как некоторые новые агенты будут иметь преимущества, которые подходят лучше для будущих суперстратегий групп, и такие особи будут размножаться в среднем более эффективно. Согласно этому предположению, значение имеет не общее количество, а общее выживание потомства, которое может быть обеспечено несколькими адаптациями, такими как меньшее по количеству, но более развитое потомство. Поэтому, если множественная конкуренция отсутствует, как могут развиваться сложные поведенческие стратегии? Если такие стратегии не возникают, то не будет возможности развития отбора более высокого уровня, что требуется для старения. Максимальная продолжительность жизни, кажется, увеличивается постоянно в модели, адаптированной согласно гипотезе Голдсмита. Возможно, это единственный вариант, при котором возможен успех группы. Такое отсутствие альтернатив, по-видимому, является причиной постоянного увеличения продолжительности жизни.

Наиболее убедительные модели MASON [2] основываются на концептах Martins [52, 53]. В первой модели, предложенной в 2011 г., вновь созданные агенты могут конкурировать с существующими за место обитания, причём каждая *индивидуальная особь* $[i]$ преобладает пропорционально $f_i(t)$. Агент *родитель* $[i]$ и *потомок* $[j]$ конкурируют во *времени* $[t]$, и агент *родитель* выживает с вероятностью $f_i(t)/(f_i(t) + f_j(t))$. Родитель наследует свою собственную приспособленность, а $+/-$ *мутации* $[M]$ добавляются в каждом поколении ($f_j = f_i + m$; $m = 0, +/- M$). Фактор *скорости изменения окружающей среды* $[d]$ используется для уменьшения приспособленности на каждом временном этапе $f_i(t+1) = f_i(t) - d$

($d \geq 0$ для каждой особи (i)). Вторая модель последовала в 2014 г., в которой параметр d избегали. Введение случайной смертности видится полезным, но является ли введение новых правил борьбы для новых агентов реалистичной ситуацией, не совсем ясно. Параметр d может быть более подходящим для описания экосистемы. В модели отмечено, что угасание приспособленности, вызываемое $[d]$, происходит так быстро, что условия окружающей среды меняются значительно в течение жизни индивидуума [2], но если один гипотетический организм живет примерно в 10 раз дольше, чем другой (как использовано в этих симуляциях; $\text{maxLifespan} = 5$ против 50), соответствующие изменения могут произойти в течение этого времени. Следует учитывать, что уменьшение приспособленности d происходит не так часто в связи с изменениями в ареале обитания во времени. Более вероятная ситуация может заключаться в накоплении последствий случайных травм у особи (что близко к идее Вейсмана). Но, скорее всего, основные факторы, влияющие на d , зависят от изменившихся интересов/стратегий популяции, что является следствием EGT. Теория указывает, что если особь приобретает полезный признак, который позволяет ей использовать новые ресурсы или использовать их лучше, чем конкурент, такой признак широко распространяется в популяции. Это происходит до тех пор, пока борьба за ресурсы не становится такой жестокой, что приобретение нового признака становится более выгодным. Такой сценарий можно проиллюстрировать на примере золотоискателя, который нашёл золотую жилу. Другие старатели, узнав об этом, тоже собираются в этом месте до тех пор, пока их не становится слишком много, и добыча золота в этом месте становится невыгодной, в то время как открытие совершенно другого бизнеса, например салуна, будет более выгодно, чем копать золото. Чтобы показать изменение стратегий в популяции, можно использовать моделирование эволюции, предложенное MinuteLabs.io & PRIMER (ML&P). Вопрос состоит не в том, подходит ли модель для ответа на вопрос о развитии старения, и не в том, насколько подходящие параметры (такие как высокая скорость изменений в каждом поколении) и размер модели и количество агентов выбраны. Важно то, что несколько преимущественных факторов (скорость, размер и чувства) могут изменяться в этой многомерной эволюции в соответствии с изменяющимися затратами. Агенты в среднем развивают свои признаки постоянно в новых комбинациях, поэтому они отличаются от предыдущих признаков старых конкурентов. Изменения в большинстве награждаются луч-

шим выживанием и более успешными потомками, как показано с помощью EGT для развития скорости и чувств среднего агента в течение нескольких поколений (рис. 2). Флуктуация параметров указывает на постоянное адаптационное давление от окружающих агентов, возникающее вследствие внутри- и межвидовой конкуренции, которую модель должна учитывать. Поэтому новые комбинации могут быть полезными для выживания в нишах. Такая успешная адаптация может установиться, если будет доступно большее количество пищи, поскольку, по-видимому, это способствует установлению субпопуляции хищников. К сожалению, такие наблюдения трудно подтвердить экспериментально, так как детальные наблюдения за всеми индивидуальными агентами в течение нескольких поколений невозможны. Однако модель Мартина 2011 г. с дополнительными подбором значений d , вероятным для EGT, оказалась наиболее ценным предложением по моделированию и использовалась соответствующим образом.

Фактор d можно избежать в моделировании, основанном на ML&P-модели, поскольку давление адаптации, подобное EGT, уже задано. В этом случае средняя жизнь агента составляет примерно два поколения вследствие ограничений пищи, но агенты могут достичь более долгой продолжительности жизни в модели. Если агенты с неограниченным и ограниченным мак-

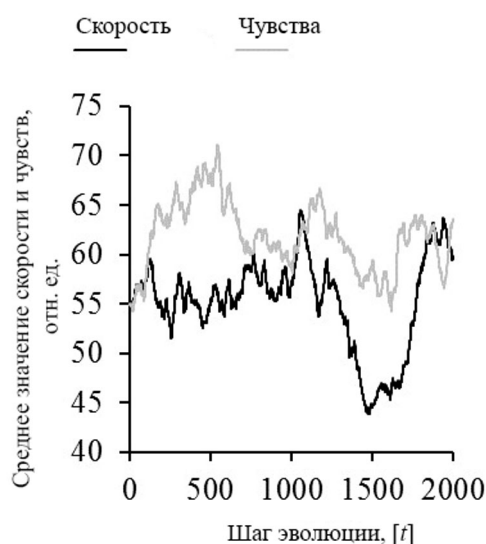


Рис. 2. Среднее изменение параметров скорости и чувств в течение максимального регулируемого жизненного цикла $[t]$. Количество дней — 2000; случайное потомство — 666 666; пища — 50, функция «изменение пищи во времени» была деактивирована, использовались только «blue blobs». Следующие параметры были использованы: число «blobs» вначале — 50; энергия — 500; скорость — 55; размер — 6; чувства — 55; σ^2 скорость — 0,5; σ^2 размер — 0,5 и σ^2 чувства — 0,5

симальным числом поколений будут участвовать в межвидовой конкуренции, часто выигрывающие стареющие агенты могут указывать на то, может ли смерть быть выгодной. Тем не менее в этой модели необходимо существенно увеличить число агентов, чтобы она была подходящей для исследовательских целей. Кроме того, необходимо добавить более или менее изолированные области для изменяющихся временных интервалов. Дополнительные эволюционные возможности, такие как изменения окружающей среды, доступ к пище и её качество или контроль над паразитами/хищниками, скорее всего, не только улучшат предсказательную силу модели для старения, но, вероятно, даже определяют результат моделирования. Кажется, что чем более многомерная симуляция используется, тем более вероятно, что более быстрая эволюция будет выгодна.

В случае, когда половое размножение доминирует над однополым в модели, уровень разнообразия, требуемый для такой *in silico* экосистемы, может больше соответствовать природному уровню, даже если он невероятно высокий. Параметры, которые помогают уже взрослым особям лучше выживать, могут быть более реалистичными. Максимальная продолжительность жизни в таком случае будет больше зависеть от эволюционной приспособленности, чем от таких обстоятельств, как случайное распределение пищи. Например, введение параметра «время взросления», в течение которого параметры молодых агентов заингибированы, может быть

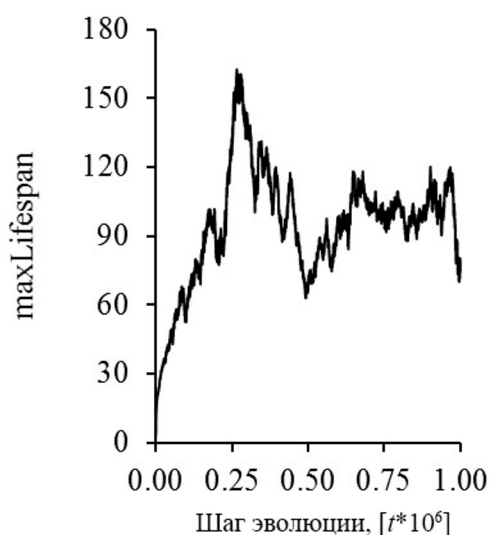


Рис. 3. Колебания maxLifespan в течение 1 млн поколений [t]. Размер мира — 250×250 ; $M = 0,03$; $d = 0,01$; начальный maxLifespan — 3,0; epsLifespan — 0,2; $b = 1$. Такие параметры, как потомство 869 413 082 и двуполые агенты, были использованы

подходящей стратегией. Кроме того, возрастные преимущества в обучении были бы полезны для повышения значимости подхода к моделированию старения, например, с помощью функции $\ln(x)$, которая вначале является сильной, а со временем уменьшается.

Формирование стабильной максимальной продолжительности жизни (maxLifespan) в модели MASON рассматривается, как показатель оптимального возраста и, таким образом, является основой возникновения запрограммированного старения. Постоянное увеличение этого параметра указывает на противоположную ситуацию [2]. В отличие от оригинальной публикации, постоянное увеличение maxLifespan не наблюдалось. Даже для двуполых агентов этот параметр осциллировал в широком диапазоне, когда этот параметр отслеживался в течение большого числа поколений (рис. 3). Этот факт может противоречить аргументу, что увеличение продолжительности жизни всегда выгодно, и что это всегда будет происходить, если не появятся некие ограничения, такие, например, как повреждения ДНК.

Если агенты выигрывают/проигрывают более долгоживущим агентам в битвах *in silico*, это может предоставить наиболее ценное доказательство преимуществ старения. Это может помочь определить, что является критически важным: большая эволюционная приспособленность или большее количество потомков? Если параметры выбраны подобно тому, как и в оригинальной публикации [2], однополые агенты с неизменяемой продолжительностью жизни (epsLifespan — 0) maxLifespan = 5,5 могут выиграть (1 из 7 битв; рис. S1, A в Приложении) у агентов с maxLifespan = 60 в случае, когда нет изменений в окружающей среде ($d = 0$), что делает развитие старения маловероятным, но не исключает его. При этом, если двуполые агенты с неизменяемым maxLifespan = 40 конкурируют с агентами с maxLifespan = 500 ($d = 0$), более быстро стареющая популяция имеет почти такие же шансы выиграть (выиграно 11 из 23 битв; рис. S1, B в Приложении). На этом основании можно предположить, что увеличение maxLifespan выше некоего предела не даёт добавочных преимуществ в этой модели, что было бы интересно исследовать, так как ожидается, что агенты с более длительным сроком жизни будут постоянно выигрывать, если исключить биологический износ. Вероятно, относительные эффекты, такие как количество агентов или их распределение, могут иметь больший эффект, чем продолжительность жизни. Такие случайности могли бы сделать модель не совсем подходящей для предсказания преимуществ

старения, и начальные условия могут значительно влиять на конечный результат. При этом нет шансов, что двуполые агенты с коротким $\text{maxLifespan} = 5,5$ могут выиграть у агентов с $\text{maxLifespan} = 60$ ($d = 0$). Короткоживущие агенты с трудом получают возможность достичь ~250 поколений (рис. S1, С в Приложении) до вымирания, в то время как вскоре после начала моделирования почти все ячейки оккупированы агентами с более высоким maxLifespan , и стареющие агенты могут превалировать только с большим трудом. Возможно, быстро стареющие агенты не имеют шансов накопить эволюционную приспособленность. В начале симуляции популяция стареющих агентов уменьшается за счёт более быстрой смерти, которую долгоживущим агентам просто нужно пережить. Уже уменьшенная популяция будет иметь меньше генетических вариаций, что уменьшает эволюционную приспособляемость, создавая, таким образом, дополнительное препятствие. Разделение популяции может способствовать разрешению такой неудобной ситуации для группы. В природе географическая изоляция, впервые описанная Эрнстом Майем, является наиболее известным способом разъединения. Поэтому в модель должна быть включена опция для разделения популяций поровну в течение регулируемого периода времени, прежде чем им будет разрешено сражаться. Преимущество более быстрой адаптации должно быть более важно в таких условиях, чем начальные условия. Это тоже может уменьшить гетерогенное распределение агента, но, по-видимому, нет никаких причин, по которым две популяции не должны развиваться раздельно до того, как они встретятся на общей границе. Это кажется более реалистичной ситуацией, например, когда исчезли географические барьеры. Для генерации старения *in silico* могут потребоваться несколько изолированных островов.

Результаты моделирования, по-видимому, зависят от того, как быстро вид должен приспособиться к таким силам, как RQH или в целом к EGT. Необходимость адаптироваться через меж- и внутривидовую конкуренцию тоже может происходить быстрее, чем ожидается, а сложность модели тоже, по-видимому, является фактором, который легко недооценить. Чем более детальная модель используется (количество, качество, распределение ресурсов, хищников, и т.д.) и чем масштабнее моделирование, тем больше вероятность того, что адаптация повлияет на популяцию, и большее давление может потребоваться для преобладания изменений.

Если половое размножение теоретически достаточно выгодно для установления в симуляциях с довольно высокой скоростью адаптации,

то, как отмечалось ранее, должна присутствовать по крайней мере такая степень адаптации, чтобы имитировать естественную систему *in silico*. Чтобы определить эти параметры, бесполое агенты должны были конкурировать с половыми в модели Мартинса 2011 г. Бесполое агенты должны были иметь преимущество более быстрого экспоненциального размножения (в 2 раза больше агентов на каждое поколение). Половые агенты должны были иметь более высокую эволюционную приспособленность за счёт обмена наследуемой информации и повысив изменчивость. Вероятность выигрыша будет определяться по стандартным правилам, но логично предположить, что сражение должно произойти дважды, если бесполое потомство сталкивается с уже оккупированной территорией. Параметры, поддерживающие двуполое размножение, могут помочь определить, какие корректировки модели будут более соответствовать реальной ситуации.

Изменения генома могут произойти за счёт накопления мутаций или комбинированного обмена, эффект которых суммируется, но конечное преимущество будет синергично во времени. Чтобы изменения смогли закрепиться, они должны в какой-то степени быть уместны, что, скорее всего, возможно только в предположении относительного улучшения. Наиболее существенной предлагаемой корректировкой модели *in silico* является то, как эволюционная приспособленность меняется от поколения к поколению. В модели Мартинса такие параметры, как преимущество распространения гена и большее число агентов, возникающих в связи с быстрой сменой поколений в течение определённого промежутка времени, введены автоматически. Мутации и другие возможные сложные комбинации генов способствуют общей изменчивости и должны быть адаптированы. Поэтому предлагается заменить M на *относительную изменчивость* (θ), которая умножается каждое поколение ($f_j = f_i \times v$; $v = 1, +/ - \theta$), что является следствием предполагаемой выгоды от смены поколений за счёт сложных процентов, уже упоминавшихся в разделах выше. Подобные относительные модификации, вероятно, будут правильными для d и epsLifespan (принятое в модели изменение продолжительности жизни в каждом поколении), и поэтому тоже могут быть использованы.

Чтобы продвинуть эволюцию, требуется определённая средняя величина приобретённых преимуществ на каждую смену поколений. Если эволюционная приспособленность будет увеличиваться в модели путём прибавления более или менее постоянной величины в каждом поколении, относительная приспособленность в нача-

ле была бы высокой. После нескольких поколений базовая приспособленность группы увеличится и достигнет высокого уровня. Дальнейшее добавление постоянного значения внесёт лишь небольшой вклад в общую накопленную способность. В такой ситуации общая приспособленность потомства не будет сильно отличаться от приспособленности родителей. Величина относительного преимущества будет несущественной, так как она приближается все ближе к нулю с каждым следующим поколением. Эволюция, основанная только на незначительных изменениях, всё же может быть успешна в моделях *in silico*. Вклад случайных эффектов, таких как количество и распределение агентов, могут иметь здесь большее значение, чем эволюционная приспособленность. Почти одинаковый шанс на успех для агентов с maxLifespan 40 и 500 может быть намёком на такую ситуацию. Если больше нет существенных различий в приспособленности для каждого поколения, случайные события, вероятно, решают, кто выживет в природе. Отбор будет бессистемным, так как направление прогресса потеряно; сила, направляющая эволюцию, исчезнет, и эволюция остановится.

В качестве упрощённого примера без отрицательной наследственности используется вероятность победы родительского агента $P_i(t)$ в моделировании MASON. Эволюция организма начинается с уровня приспособленности 1, что является обычным начальным условием, который увеличивается с каждым поколением на положительную величину $0,03 M$. В первом поко-

лении вероятность находится на уровне $\sim 0,492611 (1/(1 + 1,03))$, в то время как во втором она увеличивается до $\sim 0,492823 (1,03/(1,03 + 1,06))$. Вероятность становится равной ($\sim 0,5$), так как преимущество относительной приспособленности уменьшается с каждым поколением, в то время как общая приспособленность растёт. Для сравнения, преимущество остаётся постоянным в случае преумножения относительного преимущества (рис. 4, а). Приспособленность, следовательно, увеличивается экспоненциально благодаря предлагаемой адаптации (рис. 4, б). Благодаря такой впечатляющей экспоненциальной функции даже малейшие изменения в продолжительности жизни могут привести к существенному увеличению приспособленности для короткоживущих особей, которое может проявиться через несколько поколений. Из этого могла возникнуть высокая выгодность смерти.

Было отмечено, что половое размножение ускоряет достижение наилучших генетических комбинаций, в то время как старение ускоряет распространение выгодных генов и удаление вредных [44]. К этому утверждению можно добавить, что старение способствует генетическим выгодам, особенно в случае полового размножения.

В случае битвы между агентами, когда maxLifespan зафиксирован, только приспособленность может меняться. Поэтому в случае полового размножения модель лучше скорректировать таким образом, чтобы сделать её более естественной, что, вероятно, также усилит преимущества спаривания, согласно гипотезе Фи-

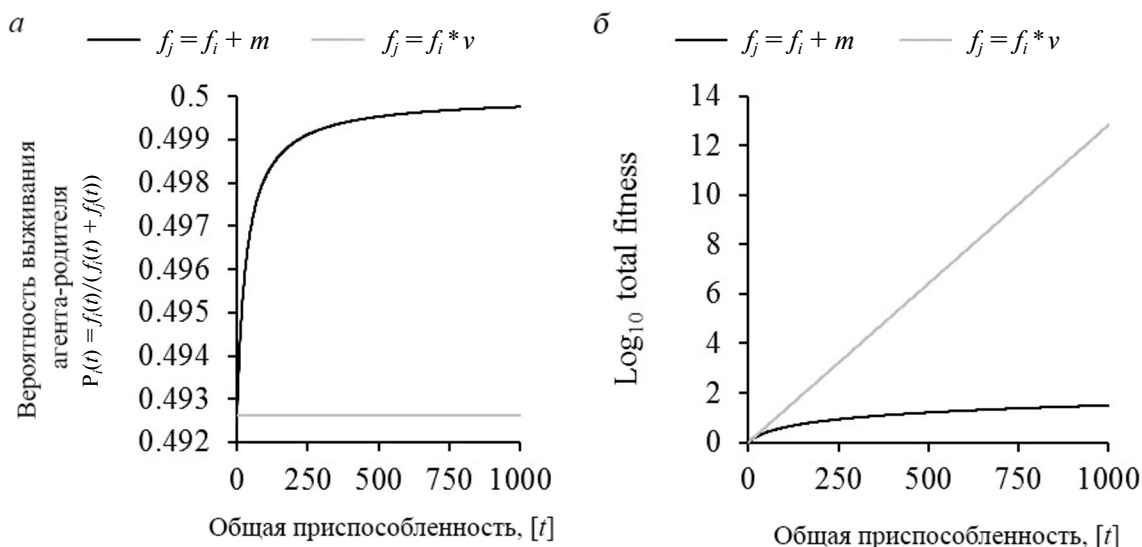


Рис. 4. Сравнение модели MASON для вероятности выживания родительских агентов $P_i(t)$ (а) и общей приспособленности на поколение $[t]$ (б). Были использованы начальные параметры моделирования Matrins ($f_j = f_i + m$; $m = 0, +/\text{--} M$) и предложенные модификации ($f_j = f_i * v$; $v = 1, +/\text{--} \theta$). Начальная величина была установлена на уровне 1, а коэффициент положительного эффекта $-0,03$ для M или θ

шера—Мюллера. Вероятно, это также уменьшит требуемую в модели изменчивость до более приемлемого уровня. Вместо одного значения приспособленности должно быть несколько (по крайней мере, два). Представляют ли эти значения полезные гены или адаптации (защита, охота за пищей, умение скрываться, иммунная защита), является вторичным. Эти значения могут случайным образом улучшаться или ухудшаться на некоторую (относительную) величину, при этом общая пригодность определяется средним значением. Таким образом, агент может выиграть битву, даже если одна из его адаптаций (умение прятаться) развита не очень хорошо, в то время как другая (защита) была бы довольно выгодной. При спаривании, как и при мейозе, каждая величина получена случайным образом от одного из родителей. Таким образом, легко себе представить, что особенно удачные рекомбинации будут активированы, предоставляя существенные преимущества агентам, размножающимся половым путём. Чем более разнообразны эти гены или приспособления, тем больше будет преимущество полового размножения, и тем более вероятным будут скачки в эволюционной приспособленности.

Поправки, предложенные здесь, необходимо обсудить, и они могут быть очень полезными. Однако считается, что хотя моделирование заставляет задуматься и обогащает дискуссию об эволюции старения, эти модели всё ещё слишком просты и приближительны, чтобы ответить на вопрос об эволюции старения в реальном мире. Можно считать, что хотя классические интерпретации эволюции старения находятся в резком контрасте с идеей запрограммированного старения, истина может быть где-то посередине [46], что кажется весьма разумным.

МЫСЛИ ВЕЙСМАНА О НЕАДАПТИВНОМ СТАРЕНИИ

Самый популярный в наше время взгляд на неадаптивное старение был описан Вейсманом в его поздних работах. Он считал, что новые формы (как и органы) должны быть не только созданы, но и поддержаны отбором. Если нет необходимости поддерживать адаптацию, точность будет уменьшаться, так как дефекты появляются случайным образом и уже не устраняются отбором. Вейсман назвал такое развитие панмиксией (стр. 62–63) [25] и предположил, что функции тоже проходят через этот процесс. Поэтому, когда природа перестает обращать внимание на бессмертие, начинается уничтожение. Это могло бы случиться с бессмертным телом

(сомой), так как другие функции, такие как движения и возбудимость, были бы более важными. Действительно, он был первым эволюционистом, обсуждающим адаптивное и неадаптивное старение. Это весьма удивительно, так как известные отцы неадаптивных теорий Медавар и Уильямс несоразмерно критиковали Вейсмана. Для полноты обсуждения необходимо отметить, что De Grey назвал идею Медавар «предвестником Дж. Б. С. Холдейна» [3]. Медавар и Уильямс просто полагались на ранние идеи Вейсмана об адаптивном старении, несмотря на то что Вейсман уже в своих ранних эссе понял, что особь теряет свою ценность для вида после размножения, за некоторыми исключениями, такими как родительская забота (стр. 9) [23]. Прежде чем предложить идею панмиксии, Вейсман уже допускал эволюционную бесполезность пострепродуктивной ситуации, когда становится очевидным снижение давления естественного отбора на старение. Это может быть критическим пунктом в теории старения Медавар, основанной на накоплении мутаций [61] и родственной теории антагонистической плейотропии [62], предложенной Уильямсом. Вейсман даже предполагал, что смертность развилась бы быстрее, если бы другой выгодный признак (тело) развился бы взамен (стр. 645–646) [63], что связано с основной идеей Уильямса — полезные для эффективного/раннего воспроизведения гены будут отобраны, даже если они могут привести к своевременной смерти. В своё время Вейсман ничего не знал о генах или мутациях; он утверждал, что существует уменьшающееся несовершенство в наследовании не очень важных органов/функций, и поэтому он практически предвосхитил основную часть теорий Медавар и Уильямса, не уточняя геномной причины. Медавар тоже упоминает предполагаемую логическую ошибку, которую, по его словам, его студент назвал «порочным кругом». Он писал, что Вейсман предполагал, что старые особи вида изношены и ветхи (в таком же состоянии, происхождение которого он намеревается вывести), а затем выдвигал предположение, что из-за того, что эти постаревшие особи занимают место здоровых, естественный отбор должен привести к истреблению больных и старых. Интересно, что Медавар предлагал возможный ответ в этой же статье: «Следующая ловушка состоит в том, что популяция предположительно бессмертных животных, подверженная опасностям реальной смерти, состоит в большинстве своём из очень старых особей и относительно маленького числа запуганных молодых, которые путаются между ног стариков». Медавар мог сам попасть в такую логическую ловушку, так как он не верил в то,

что кратковременный процесс отбора достаточно эффективен, чтобы преодолеть преимущества взрослых или опытных организмов. Это отрицало бы идею порочного круга. Подобно Дарвину и Уоллесу, Вейсман был убеждён, что селекция происходит очень маленькими шажками (стр. 47) [64], которые, вероятно, исключают предположение, что молодые эволюционируют достаточно быстро, чтобы вытеснить старых.

Медавар дальше критиковал эту теорию, приводя статистический пример с пробирками: при нормальных условиях объект, который не уничтожается со временем, будет уничтожен случайно с определённой вероятностью ($e^{-b \cdot x}$). Цель этого была показать, что предположения Вейсмана о том, что естественное старение бесполезно, так как увеличение продолжительности жизни должно быть непрактичным из-за случайных стихийных бедствий. Следует отметить, что Либертини использовал похожий пример существования определённой вероятности, но предполагал другое допущение. Он сравнивал гипотетическую смертность, основанную на случайности, и указал на увеличенные уровни смертности с возрастом у зебр и буйолов, что привело его к заключению, что старение может активно увеличивать уровень смертности [15]. Тем не менее Вейсман признавал, что смерть — это действительно случайное событие для каждого индивидуума, но поддаётся расчёту для популяции, и предполагал, что каждый вид должен размножаться как можно раньше и как можно быстрее (стр. 12–13) [23]. Он заявил это ещё до того, как начал обсуждать свою теорию износа, и упомянул бесполезность долгой жизни для некоторых особей, приводя в пример насекомых, так как почти все они довольно рано становятся жертвами своих врагов (стр. 24) [23]. Вейсман показал, что он принял во внимание статистические доводы Медавара о случайности смерти и никогда не ставил под сомнение тщетность продления жизни во многих случаях. Решающее значение имеют его объяснения возможной целесообразности сокращения жизни.

В своей теории износа Вейсман не утверждает, что невозможно идеальное восстановление незначительных повреждений; его мысли вращались вокруг факта, что полная целостность («*in integrum*») и идеальное восстановление всех потенциальных повреждений вряд ли можно себе представить (стр. 30–31) [23]. Медленное развитие процесса (травма сегодня и через 10 лет) является ещё одним нюансом и вставками в текст, которые можно воспринять во всей полноте только на языке оригинального издания. Это подразумевает, что индивидуум может быть

приспособленным к жизни в течение долгого времени, может быть веками, пока все эти небольшие невосстанавливаемые повреждения не накопятся и не приведут к смерти. По мнению Вейсмана, если особь занимает свою нишу слишком долго, это ускоряет приход смерти. В среднем смерть предотвращает слишком продолжительную жизнь. Это важно, потому что Медавар строит свои аргументы (как в случае с порочным кругом) на базе воображаемого организма, который быстро деградирует, а не на организме, который ведёт здоровую жизнь долгое время.

Тогда зачем Вейсман защищал идею естественной смерти в своих ранних работах, в то время как он понимал необычность некоторых ситуаций? Для него было настолько само собой разумеющимся, что для процесса отбора важны интересы вида, а не индивидуально организма, что он считал это базовой идеей своей лекции, и отказывался говорить об этом, так как считал, что любой, кто действительно задумывался о процессе отбора, должен знать об этом (стр. 9) [23]. Весьма вероятно, что идеи Вейсмана базировались на отборе более высокого уровня, что может быть ключевым моментом, если в наши дни можно оправдать запрограммированное старение.

ПРОТИВОРЕЧИВОЕ НАСЛЕДИЕ ВЕЙСМАНА

Теории Вейсмана должны исследоваться в широком контексте; в противном случае это, вероятно, приведёт к неполному пониманию его образа мыслей. Вейсман знал, что предложенная им теория износа является очень гипотетической; он отметил непосредственно в начале своего объяснения, что вряд ли можно предположить, что бессмертная особь может избежать все случайности, разрушающие жизнь, бесконечно (стр. 30) [23]. В своих работах он обычно приводит слишком много упрощённых и, соответственно, несовершенных примеров, иллюстрирующих его идеи. В более поздней работе он ответил на критику своего великого современника (Александра Вильгельма Гётте), что он никогда не думал о борьбе между бессмертными и смертными особями, как это иногда предполагается в наши дни. Вейсман предполагал, что получить пользу для группы можно уже за счёт сокращения продолжительности жизни (стр. 43) [64].

В более поздних работах Вейсман отвергал своё прежнее представление о смерти и оправдывал её существование необходимым разделением на бессмертный зародыш и высокоспециа-

лизированные клетки тела (сомы) в высших организмах. Он предполагал, что зародышевые клетки сделали постоянное выживание всего организма ненужным и даже непригодным для сохранения группы (стр. 306–307) [65]. Вейсман уточняет, что тело непригодно для вечной жизни — вероятно, одно из его самым решающим замечанием. В связи с тем, что он не предоставил никаких объяснений, это утверждение нельзя точно интерпретировать, и контекст не сильно помогает в этом смысле. Бессмертные, но менее специализированные клетки могут больше повредить эволюционной приспособленности по сравнению с высоко оптимизированными, но смертными. В таком случае, почему клетки тканей, в которых метаболизм (функции) нарушены, не могут время от времени восстанавливать баланс (регенерироваться)? Этот неразрешённый вопрос упомянут в одном из ранних эссе Вейсмана (стр. 87) [23]. Однако Вейсман все же верил в целесообразность смерти, и не было намёка в его поздних работах, что он отверг идею о приоритете интересов видов (групп). В этом случае было бы важно определить, как это может мешать его неадаптивным идеям? Тем не менее необходимо отметить, что такое утверждение могло быть пропущено в работах Вейсмана, которые эклектичны и всеобъемлющи. Кроме того, он имеет тенденцию вставлять чёткие и ключевые утверждения в абсолютно не относящиеся к делу скучные разделы, поэтому они иногда остаются незамеченными.

ОБОСНОВАНЫ ЛИ СПОРЫ О НЕАДАПТИВНЫХ ИДЕЯХ?

Почему споры об адаптивной или неадаптивной теории старения всё время возвращаются? Может быть, потому, что известны оба обстоятельства: когда природа стремится отобрать полезные для сохранения признаки, а также, когда игнорирует несущественные признаки. Уменьшенная способность к сохранению клеток может быть поддержана компонентами запрограммированного старения, что может указывать на то, что эти две теории не должны быть взаимоисключающими [66]. Можно себе представить и промежуточную ситуацию, когда неадаптивные недостатки приводят к выгодам смены поколений, и поэтому отбираются.

Ответы на три фундаментальные вопроса определяют наше мнение о смерти. Существуют ли выгоды от смерти? Если да, то может ли природа осуществлять надындивидуальный отбор? Если да, то выбирает ли природа косвенно или посредством контролируемого процесса? Если

верить в активный отбор, то будет наиболее разумно рассматривать этот процесс в контексте адаптивных теорий, которые подразумевают существование позитивного отбора для контролируемого окончания жизни, и это было бы запрограммированным старением [67]. Аргументы, свидетельствующие в пользу регулируемого старения и предполагаемые недостатки неадаптивных теорий, были представлены в других публикациях [44, 46, 68].

Для организмов, существующих в больших количествах в ограниченных ареалах обитания, таких как лосось или подёнки в реках, смерть после размножения будет полезна для сохранения ресурсов или потомства, удобрения среды обитания или снижения давления хищник/паразит. Удивительно, что бессмертие или существенное увеличение продолжительности жизни не развиваются у таких видов, как пчелы и муравьи. Увеличение продолжительности жизни наблюдается у репродуктивных организмов, но это увеличение очень далеко от биологического бессмертия. Организмы этой высшей касты хорошо защищены от внешних воздействий, что существенно уменьшает вероятность смерти, вызванной окружающей средой, и у этой группы было достаточно времени (миллионы лет) для развития. Это может указывать на то, что природа не стремится развивать бесконечную продолжительность жизни, так как это до настоящего времени не было обнаружено, даже если это кажется целесообразным и осуществимым.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВНОГО СТАРЕНИЯ

Пренебрежение давлением отбора было одной из важных причин отказа от идеи запрограммированного старения. Новое понимание того, что старение широко распространено в природе, уменьшило значимость одного из традиционных аргументов (отсутствие давления отбора) против запрограммированного старения [2], и эту тему, возможно, следует пересмотреть.

Любое сокращение жизни, основанное на неких дефектах, должен привести к косвенному отбору, если это выгодно. Так как пассивный отбор и возможные способы влияния на него ограничены, мы сосредоточимся на активном пути старения. В связи с этим необходимо дать точное определение регулируемого/запрограммированному старению. Либертини предложил, что это и есть активная форма старения, характеризующаяся увеличением смертности с увеличением хронологического возраста в популяциях в дикой природе [15].

Скулачёв считает, что старение способствует прогрессивной эволюции полового размножения [16], предполагая старый эволюционный путь. Вейсман считал, что смерть была изобретена в многоклеточных организмах (стр. 87) [23], тоже склоняясь к раннему эволюционному пути развития. Выглядит вполне логично, что, если запрограммированное старение существует, оно должно было развиваться в первичной жизни. Если идея смерти способствует эволюционным изменениям за счёт быстрой смены поколений, это может быть выгодным и для одноклеточных организмов, что указывает на ещё более древний механизм.

Вычисления должны быть включены в программу старения, и Голдсмит считал, что, если старение преднамеренно вызвано биологической программой, она, вероятно, должна включать часовой механизм [69]. Оловников представил теоретический концепт, в котором независимый астрономический биохронометр регулирует старение [70]. Точные количества могут тоже определяться с помощью хронологического/астрономического времени или по репродукционному номеру. Оба сигнала могут использоваться одноклеточными организмами. Счёт времени с определённой гибкостью может быть основным путём в сложной жизни, в которой зародышевые клетки и клетки тела разделены. Это не исключает начальную активацию программы старения, которая, скорее всего, происходит через половое взросление многоклеточного организма. Такая ситуация, скорее всего, имеет место у *Hydra* [71] и может служить начальной точкой для идентификации метаболических путей, связанных с возрастом.

Воображаемый путь старения, скорее всего, тесно переплетается с ключевыми процессами развития. В противном случае его можно легко деактивировать. В связи с этим Хмелевски упомянул, что возможность прекращения старения посредством мутаций, которые ингибируют генетическую программу, могло бы иметь негативные, или даже иметь полулетальные, или смертельные последствия в дикой природе; он перечислил более слабые модельные организмы, сидящие на диете, а также тяжёлое ингибирование передачи сигналов TOR и инсулина/IGF-1 или проблемное эпигенетическое репрограммирование [72]. Из этого Хмелевски сделал вывод, что такие часто игнорируемые эффекты могут быть причиной ограниченной способности отбора устранять запрограммированное старение, что тоже предполагает связь с летальными последствиями.

Тем не менее старение или метаболические пути, инициирующие старение, могут быть ру-

диментарными и активироваться только в определённых обстоятельствах (у видов, которым присуща семелпария), где это кажется выгодным. Если бы был возможен активный или косвенный возрастной отбор, они, вероятно, также взаимодействовали бы друг с другом.

ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ И СВЯЗЬ С ИЗМЕНЕНИЕМ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

Периодическая смена дня и ночи существует с тех пор, как возникла Земля, и, вероятно, является самым стойким счётчиком времени для биологических организмов. Из этого следует, что циркадные ритмы (ЦР) имели возможность возникнуть на ранних этапах эволюции. Следовательно, это может быть наиболее подходящим фактором старения. Отсутствие таких раздражителей могло сказаться на продолжительности жизни организмов, живущих в пещерах или на глубоководье. Например, европейский протей (*Proteus anguinus*), который весит около 15–20 г, может дожить примерно до 100 лет [73], возраст которого, вероятно, также достигает атлантический большеротый (*Hoplostethus atlanticus*) [74], а Гренландская полярная акула (*Somniosus microcephalus*) в настоящее время считается самым долгоживущим позвоночным (продолжительность жизни 392 ± 120 лет) [75].

Голдсмит отмечал, что ЦР и сезоны спаривания являются самыми полезными биологическими часами [76], хотя он, скорее всего, не рассматривал молекулярные основы этих явлений, как драйверов старения, не смотря на то что уже существовали доказательства ключевой роли ЦР в продолжительности жизни и клеточном старении у живых организмов, а также другие возможные варианты продления жизни [77–80]. Была замечена двунаправленная связь между старением и генами биологических часов: ЦР-гены не только изменялись в процессе старения, более того, наблюдалось обратное, когда мутации модифицировали фенотип старения у плодовой мушки и у мышей [81]. Также упоминалась, что существуют связи между ЦР и окислительным стрессом [82]. Но только недавняя статья осветила ассоциации с запрограммированным старением [83], были описаны корреляции с GSK3B1, влияющими на NRF2. В этой работе особое внимание уделялось антиоксидантному клеточному ответу, опосредованному NRF2, поскольку исходно повышенные уровни NRF2 (и сниженный KEAP1) коррелируют с повышенными уровнями антиоксидантных белков (HMOX1, GSTA1 и NQO1) и, по-видимому, с

увеличением продолжительности жизни в пределах семейства грызунов [84]. Этот процесс может непосредственно регулироваться белками ЦР, например, BMAL1 (через NRF2), о чём свидетельствует снижение транскрипции *Hmox1*, *Gsr* и *Nqo1* в макрофагах [85]. Однако, по-видимому, существует петля обратной связи, в которой NRF2 регулирует ЦР [86]. В обзорной статье также упомянуты другие механизмы регуляции изменения NRF2, зависящие от циклических осцилляций, такие как фосфорилирование, ацетилирование и протеасомная деградация. Кроме того, изофермент GSK3B1 и его многочисленные регуляторные возможности, скорее всего, связанные с NRF2, по-видимому, являются центром возрастных изменений. Тем не менее существуют и другие указания на то, что ЦР оказывают влияние и могут даже быть реальной движущей силой старения, и её следует учитывать.

Мыши с нокаутом генов *Bmal1* или *Clock* демонстрируют уменьшенную продолжительность жизни и фенотипы преждевременного старения, такие как катаракта, саркопения, уменьшение подкожного жира, усыхание органов или дерматит [77, 87]. Особенно удивительным является быстрое развитие клеточного старения у мышей с нокаутом гена *Bmal1* [78], что позволяет предположить существование сигнального пути, который изменяет путь старения не только косвенно, как можно было бы предположить из-за повышенного уровня стресса при нарушенном цикле день/ночь. Например, эффекты изменения жизни у *Drosophila* хорошо описаны для петли отрицательной обратной связи центральных гетеродимеров ЦР, когда делеции *Per* или *Tim* обеспечивали продление жизни, и противоположное происходит, если отсутствовали *Clock* или *Cycle* [88]. Кроме того, у мух в диапаузе наблюдается подавление пути ЦР [89]. Все факты, взятые вместе, могут свидетельствовать о том, что ЦР-путь сильно влияет, по крайней мере на старение.

Другой установленный способ увеличения продолжительности жизни — это ограничение калорий [90], для которого в 2010 г. были выявлены зависящие от продолжительности жизни ассоциации с генами ЦР, такими как «take-out» [91]. При сравнении кормления *ad libitum* (питания, ограниченного по времени) и голодания было показано, что ограничение калорий регулирует экспрессию таких ЦР-генов, как *Per1*, *Per2*, *Cry2*, *Cry1*, *Bmal1* и *Clock* [92]. Ограничение калорий также восстанавливает геномные признаки старения в печёночном транскриптом путём репрограммирования ЦР [93].

Эпигенетические часы — ещё один признак старения [94, 95], в настоящее время они счита-

ются наиболее точным инструментом для определения биологического возраста. Таким образом, примечательно, что некоторые признаки эпигенетического старения/долголетия, кажется, сильно вовлечены в ЦР, например, осциллирующие модификации цитозина перекрываются с возрастными эпигенетическими изменениями ДНК [96]. Кроме того, гиперметилирование и ацетилирование гистонов хорошо коррелируют и часто приводят к эпигенетической транскрипционной отмене, что оказывает влияние на такие гены, как супрессоры опухолей. Интересно, что изменения в ацетилировании белков, как и в гистонах, происходят с возрастом и в результате ограничения калорийности [93], что удивительно, так как ЦР-гены (такие как *Clock*) взаимодействуют с гистонацетилтрансферазами, приводя к циркадным ритмам ацетилирования [96]. Само ацетилирование гистонов тоже вовлечено в старение, следовательно, влияние на продолжительность жизни, вероятно, зависит от ацетилтрансферазы [97].

Вещества, продлевающие жизнь, также тесно связаны с ЦР-зависимыми генами (например, низкие дозы лития для некоторых организмов, таких как *Caenorhabditis elegans* или человек) [98]. Вероятно, это работает через ингибирование белка GSK3B [99], которое связано обратной связью с ЦР [100]. Изоформа GSK3B стабилизирует NR1D1 (REV-ERBA), в то время как литий вызывает протеасомную деградацию и активирует *Bmal1* [101]. Литий влияет также на некоторые другие ЦР-гены, такие как *Per2*, *Cry1* и *Cry2* [102]. Вальпроевая кислота увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* [103], изменяет экспрессию *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* и *Nr1d1* [104, 105]. Удивительным является тот факт, что литий и вальпроевая кислота эффективно способствуют репрограммированию клеток, усиливая экспрессию плюрипотентных генов [106], что может быть следствием изменений генов ЦР, также предполагается, что накопление p53, происходящее с возрастом, может быть уменьшено литием [107] и что вальпроевая кислота уменьшает стресс, вызванный старением во время репрограммирования [108]. Кроме того, оба химических вещества также известны как ингибиторы гистонацетилтрансферазы (HDAC), с синергетическими эффектами, а также взаимодействуют с несколькими ингибиторами HDAC, такими как трихостатин А (TSA) [109, 110]. TSA, видимо, необходим для эффективного клонирования мышей (>25 поколений) [111], что является важной информацией, так как ингибирование HDAC запускает механизм, связанный с теоретической возможностью бессмертия соматических клеток. Воз-

возможность переноса ядер соматических клеток (клонирование) доказывает, что каждая клетка имеет возможность стать бессмертной, хотя пути репрограммирования всего организма ещё не изучены. На основании этого можно предположить, что такого рода ассоциации со старением могут быть каким-то образом выгодны. В противном случае тело будет способно к полной регенерации, если это будет выгодно для эволюционной приспособленности, как это наблюдается для *Hydra* [71]. ЦР или затронутые мишени, такие как HDAC, по-видимому, связаны с омоложением.

Другие корреляции тоже стоит отметить. Существует наиболее релевантный против старения препарат, рапамицин [112], и детально описанные гены долголетия *Foxo3* [113] и *Ampk* [114, 115], которые модулируют циркадные ритмы. Карликовые мыши известны своим долголетием и экстремальным сокращением клеток передней доли гипофиза. При этом сильно снижается секреция гормона роста, пролактина и тиреотропного гормона [116]. Эти гормоны известны своей зависимостью от ритма день/ночь и вкладом в старение. Другой гормон, изменяющий дневной цикл — это кортизол, содержание которого можно уменьшить с помощью метформина — вещества, улучшающего здоровье и продолжительность жизни [117]. Перепроизводство кортизола является центральным звеном индуцированной смерти у видов, которым присуща семелпария, таких как лососёвые и сумчатые [118]. Кроме того, хорошо известно, что кортизол снижает активность тимуса и некоторых важных клеток, связанных с иммунной системой [119]. У сумчатых основной причиной смертности, по-видимому, является недостаточность иммунной и противовоспалительной систем [5]. У итеропарных позвоночных процесс, видимо, очень похож, но происходит медленнее, причём старение иммунной системы тоже взаимосвязано с развитием слабого, но увеличивающегося хронического воспаления (воспалительное старение), в котором такие стрессоры, как кортизол, играют решающую роль [120].

Кроме того, другие гормональные изменения, зависящие от ЦР, могут тоже влиять на изменение продолжительности жизни [121, 122]. В целом высокая степень пострепродуктивного старения, по-видимому, предопределена у семелпарных видов [6, 123], и старение, видимо, происходит схожим образом в некоторых видах. Усыхание тимуса с возрастом и старение иммунной системы являются примерами, наблюдаемыми у сезонных млекопитающих [5, 124] и рыб [125], а также у организмов с множественными циклами размножения, таких как чело-

век. Возможно, поэтому Скулачёв различает два типа старения — острое старение, как у семелпарных видов, и мягкое старение — у других видов [16]. Противоположное мнение было высказано De Grey, который считает, что фактически контрпродуктивно вообще рассматривать семелпарность как тип старения [3]. Однако это явление наблюдается у широкого круга различных существ. Так как регуляция этого процесса не может быть полностью исключена, возникает вопрос, присутствуют ли аналогичные процессы в генетике всех живых существ или не представляет ли семелпарность совершенно другой тип старения.

В заключение можно сказать, что если активная регуляция продолжительности жизни существует, то ЦР могут считаться ключевым регулятором каскада, вызывающего старение, может быть также регулируемого мозгом (супрахиазматическое ядро), опосредованно через гормоны. Такие заключения слегка отличаются от предложенного группой Шиловского, которые указывают, что центральный часовой механизм влияет и на ЦР, и на GSK3B, приводя к увеличению активных форм кислорода при старении, опосредованном NRF2. Можно себе представить ситуацию, когда ЦР сами являются такими центральными координаторами, потому что эффекты удаления в рамках механизма обратной связи полностью противоположны. Чёткий механизм обратной связи всегда обеспечивает достижимую цель для регулирующего вмешательства. При этом NRF2 и его пути будут одной из многих мишеней, а поскольку GSK3B колеблется в течение дня в обратной связи с такими белками, как BMAL1, его можно отнести ко всем другим более или менее важным белками ЦР.

По всей вероятности, окислительный стресс в клетках, опосредованный, скорее всего, метаболическими путями, связанными с глутатионом, оказывает большое влияние на старение. Однако не трудно себе представить, что ЦР существенно влияют по меньшей мере на столь же важные биологические функции, как воспаление, контроль качества белка или протеасомную деградацию, а также на (энергетические) метаболические пути. Кроме того, нельзя исключить существование не обнаруженного или не установленного пути изменения старения, связанного с влиянием ЦР, который может включать гены, непосредственно связанные с апоптозом, контролем повреждений ДНК и активацией старения. По мнению авторов, старение ещё недостаточно изучено, и такие возможности нельзя исключать. Например, недостаточно данных, объясняющих, как внутриклеточная медь может

модулировать долголетие [126] — связано ли это со стрессом, вызванным эффектом ионов тяжёлого металла, или вовлечены другие механизмы?

Инициацию программы старения можно себе представить как механизм изменения ЦР, при которых модификации цитозина во время ежедневных эпигенетических осцилляций не полностью удаляются и накапливаются последовательными нарастающими шагами, что приводит к изменению транскрипции, вызывая медленно нарастающие нарушения клеточных функций. Другой весьма возможный механизм может включать изменения в модификации белков (например, способность к деацетилированию) во времени. Например, изменения в ацетилировании гистонов могут препятствовать транскрипции более конденсированными структурами ДНК. Дальнейшие модификации, которые изменяются в течение жизни, также возможны и могут взаимодействовать различными способами, а механизмы, связанные с эпигенетическими факторами, могут дополнять друг друга. Следовательно, старение может быть вызвано модификациями ДНК и белков, происходящими в соответствии с циркадными ритмами. Контролируется ли такая дегенерация или восстановление умышленно предотвращается, ещё надо выяснить, что, по-видимому, не просто сделать. Эту идею легко отнести к гипотезам о разрушении сети, поскольку аккультурация неадаптивных несовершенств, таких как липофусцин, с течением времени также может быть возможным развитием и может привести к дисрегуляции сети ЦР, которая, таким образом, является лишь побочным продуктом старения. В заключение остановимся на вопросе Вейсмана о том, почему соматические клетки не способны к регенерации время от времени, как это происходит на ранних стадиях развития, согласно современным концепциям. Кроме уже упомянутых возможностей, надо обратить внимание на ингибирование HDAC, которое, вероятно, связано с омоложением, что может послужить многообещающим направлением исследований поведения генов ЦР и модификаций ДНК/белков во время терапии. Было бы интересно узнать, являются ли ЦР движущей силой в накоплении изменений в биологических структурах (таких как агрегация ДНК или белков), и какие могут быть последствия этого.

Как бы то ни было, у исследований может быть дополнительная многообещающая цель в возможных подходах к предотвращению старения. В результате это может помочь выяснить, является ли старение адаптивным процессом или нет.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) в учебно-исследовательской группе 2155 (ProMoAge).

Благодарности. Авторы благодарны Claudia Rubie (Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) за поддержку предположения возможности регулирования старения во время персонального разговора на торжественном обеде во время симпозиума в Heart Centre University Hospital of Halle (Saale) в сентябре 2019 года.

Авторы также благодарны Biodiversity Heritage Library и University of Toronto (Gerstein Science Information Centre) и сотрудникам Университетской библиотеки Freiburg i. Br. за предоставление доступа к работам Вейсмана.

Авторы также благодарят авторов модели старения MASON за предоставление доступа и за удобство пользования [2].

Вклад авторов. PRW был ответственен за приготовление манускрипта. AS внёс исправления в манускрипт и предоставил доступ к литературе.

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.

Дополнительная информация. Используемые программы: MinuteLabs.io & PRIMER доступен на <https://labs.minutelabs.io/evolution-simulator>. Код программирования доступен на <https://github.com/minutelabsio/evolution-simulator>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen, A. A., Kennedy, B. K., Anglas, U., Bronikowski, A. M., Deelen, J., et al. (2020) Lack of consensus on an aging biology paradigm? A global survey reveals an agreement to disagree, and the need for an interdisciplinary framework, *Mech. Ageing Dev.*, **191**, 111316, doi: 10.1016/j.mad.2020.111316.
2. Kowald, A., and Kirkwood, T. B. L. (2016) Can aging be programmed? A critical literature review, *Aging Cell*, **15**, 986–998, doi: 10.1111/ace.12510.
3. De Grey, A. D. (2007) Calorie restriction, post-reproductive life span, and programmed aging: a plea for rigor, *Ann.*

- N. Y. Acad. Sci.*, **1119**, 296–305, doi: 10.1196/annals.1404.029.
4. Hughes, P. W. (2017) Between semelparity and iteroparity: empirical evidence for a continuum of modes of parity, *Ecol. Evol.*, **7**, 8232–8261, doi: 10.1002/ece3.3341.
5. Oakwood, M., Bradley, A. J., and Cockburn, A. (2001) Semelparity in a large marsupial, *Proc. Biol. Sci.*, **268**, 407–411, doi: 10.1098/rspb.2000.1369.
6. Kraaijeveld, K., Kraaijeveld-Smit, F. J., and Adcock, G. J. (2003) Does female mortality drive male semelparity in dasyurid marsupials? *Proc. Biol. Sci.*, **270** Suppl 2, S251–253, doi: 10.1098/rsbl.2003.0082.
7. Leopold, A. C. (1961) Senescence in plant development: the death of plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value, *Science*, **134**, 1727–1732, doi: 10.1126/science.134.3492.1727.
8. Dawkins, R. (2003) The Evolution of Evolvability, in *On Growth, Form and Computers* (Kumar, S., and Bentley, P. J., eds) Academic Press, pp. 239–255, doi: 10.1016/B978-012428765-5/50046-3.
9. Kirschner, M., and Gerhart, J. (1998) Evolvability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8420–8427, doi: 10.1073/pnas.95.15.8420.
10. Wagner, G. P., and Altenberg, L. (1996) Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability, *Evolution*, **50**, 967–976, doi: 10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x.
11. Brakefield, P. M. (2006) Evo–devo and constraints on selection, *Trends Ecol. Evol.*, **21**, 362–368, doi: 10.1016/j.tree.2006.05.001.
12. Landry, C. R., Lemos, B., Rifkin, S. A., Dickinson, W. J., and Hartl, D. L. (2007) Genetic properties influencing the evolvability of gene expression, *Science*, **317**, 118–121, doi: 10.1126/science.1140247.
13. Goldsmith, T. C. (2004) Aging as an evolved characteristic — Weismann's theory reconsidered, *Med. Hypotheses*, **62**, 304–308, doi: 10.1016/S0306-9877(03)00337-2.
14. Goldsmith, T. C. (2008) Aging, evolvability, and the individual benefit requirement; medical implications of aging theory controversies, *J. Theor. Biol.*, **252**, 764–768, doi: 10.1016/j.jtbi.2008.02.035.
15. Libertini, G. (1988) An adaptive theory of increasing mortality with increasing chronological age in populations in the wild, *J. Theor. Biol.*, **132**, 145–162, doi: 10.1016/s0022-5193(88)80153-x.
16. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1191–1195.
17. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418–1426.
18. Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2014) New data on programmed aging — slow phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 977–993, doi: 10.1134/S0006297914100010.
19. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., et al. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491–6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
20. Blackburn, E. H. (2000) Telomere states and cell fates, *Nature*, **408**, 53–56, doi: 10.1038/35040500.
21. Libertini, G. (2015) Phylogeny of aging and related phenoptotic phenomena, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1529–1546, doi: 10.1134/S0006297915120019.
22. Libertini, G., Corbi, G., and Nicola, F. (2020) Importance and meaning of TERRA sequences for aging mechanisms, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1505–1517, doi: 10.1134/S0006297920120044.
23. Weismann, A. (1882) *Ueber die Dauer des Lebens; ein Vortrag*, G. Fischer, Jena.
24. Weismann, A. (1891) *Amphimixis; oder: die Vermischung der Individuen*, G. Fischer, Jena.
25. Weismann, A. (1886) *Die Bedeutung der sexuellen Fortpflanzung für die Selektions-Theorie*, G. Fischer, Jena.
26. Smith, J. M. (1976) Group selection, *Quarterly Rev. Biol.*, **51**, 277–283.
27. Wilson, D. S. (1975) A theory of group selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 143–146, doi: 10.1073/pnas.72.1.143.
28. Hamilton, W. D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. I, *J. Theor. Biol.*, **7**, 1–16, doi: 10.1016/0022-5193(64)90038-4.
29. Nowak, M. A., Tarnita, C. E., and Wilson, E. O. (2010) The evolution of eusociality, *Nature*, **466**, 1057–1062, doi: 10.1038/nature09205.
30. Briolat, E. S., Burdfield-Steel, E. R., Paul, S. C., Ronka, K. H., Seymoure, B. M., et al. (2019) Diversity in warning coloration: Selective paradox or the norm? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **94**, 388–414, doi: 10.1111/brv.12460.
31. Kadri, S., Metcalfe, N., Huntingford, F., and Thorpe, J. E. (1995) What controls the onset of anorexia in maturing adult female atlantic salmon, *Funct. Ecol.*, **9**, 790–797.
32. Naeger, N. L., Peso, M., Even, N., Barron, A. B., and Robinson, G. E. (2013) Altruistic behavior by egg-laying worker honeybees, *Curr. Biol.*, **23**, 1574–1578, doi: 10.1016/j.cub.2013.06.045.
33. Carter, G. G., Farine, D. R., Crisp, R. J., Vrtilek, J. K., Ripperger, S. P., et al. (2020) Development of new food-sharing relationships in vampire bats, *Curr. Biol.*, **30**, 1275–1279.e1273, doi: 10.1016/j.cub.2020.01.055.
34. Roberts, J. D., Bebenek, K., and Kunkel, T. A. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1, *Science*, **242**, 1171–1173, doi: 10.1126/science.2460925.
35. Weismann, A. (1887) *Ueber die Zahl der Richtungkörper und über ihre Bedeutung für die Vererbung*, G. Fischer, Jena.
36. Bi, K., and Bogart, J. P. (2010) Time and time again: unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) are the oldest unisexual vertebrates, *BMC Evol. Biol.*, **10**, 238, doi: 10.1186/1471-2148-10-238.
37. Smith, J. M. (1971) What use is sex? *J. Theor. Biol.*, **30**, 319–335, doi: 10.1016/0022-5193(71)90058-0.
38. Trivers, R. (1983) The evolution of sex: the masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality. Graham Bell, *Quarterly Rev. Biol.*, **58**, 62–67, doi: 10.1086/413059.
39. Hamilton, W. D. (1980) Sex versus non-sex versus parasite, *Oikos*, **35**, 282–290, doi: 10.2307/3544435.
40. Jaenike, J. (1977) A hypothesis to account for the maintenance of sex in populations, *Evol. Theory*, **3**, 191–194.
41. Hartung, J. (1981) Genome Parliaments and Sex with the Red Queen, in *Natural Selection and Social Behavior* (Alexander, R. D., and Tinkle, D., eds.) Chiron, N.Y., pp. 382–404.
42. Lively, C., Craddock, C., and Vrijenhoek, R. (1990) Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish, *Nature*, **344**, 864–866, doi: 10.1038/344864a0.
43. Quattro, J. M., Avise, J. C., and Vrijenhoek, R. C. (1992) An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: Poeciliidae), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 348–352, doi: 10.1073/pnas.89.1.348.
44. Libertini, G. (2017) Sex and Aging: A Comparison between Two Phenoptotic Phenomena, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1435–1455, doi: 10.1134/S0006297917120045.
45. Dobrowolski, P., Fischer, M., and Naumann, R. (2018) Novel insights into the genetic background of genetically modified mice, *Transgenic Res.*, **27**, 265–275, doi: 10.1007/s11248-018-0073-2.
46. Lenart, P., and Bienertova-Vasku, J. (2017) Keeping up with the Red Queen: the pace of aging as an adaptation,

- Biogerontology*, **18**, 693-709, doi: 10.1007/s10522-016-9674-4.
47. Mitteldorf, J., and Pepper, J. (2009) Senescence as an adaptation to limit the spread of disease, *J. Theor. Biol.*, **260**, 186-195, doi: 10.1016/j.jtbi.2009.05.013.
 48. May, R. M., and Anderson, R. M. (1983) Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **219**, 281-313, doi: 10.1098/rspb.1983.0075.
 49. Howard, R. S., and Lively, C. M. (1994) Parasitism, mutation accumulation and the maintenance of sex, *Nature*, **367**, 554-557, doi: 10.1038/367554a0.
 50. Otto, S. P., and Nuismer, S. L. (2004) Species interactions and the evolution of sex, *Science*, **304**, 1018-1020, doi: 10.1126/science.1094072.
 51. Lively, C. M. (2010) Parasite virulence, host life history, and the costs and benefits of sex, *Ecology*, **91**, 3-6, doi: 10.1890/09-1158.1.
 52. Martins, A. C. (2011) Change and aging senescence as an adaptation, *PLoS One*, **6**, e24328, doi: 10.1371/journal.pone.0024328.
 53. Mitteldorf, J., and Martins, A. C. (2014) Programmed life span in the context of evolvability, *Am. Nat.*, **184**, 289-302, doi: 10.1086/677387.
 54. Keightley, P. D., Ness, R. W., Halligan, D. L., and Haddrill, P. R. (2014) Estimation of the spontaneous mutation rate per nucleotide site in a *Drosophila melanogaster* full-sib family, *Genetics*, **196**, 313-320, doi: 10.1534/genetics.113.158758.
 55. Blount, Z. D., Barrick, J. E., Davidson, C. J., and Lenski, R. E. (2012) Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population, *Nature*, **489**, 513-518, doi: 10.1038/nature11514.
 56. Cohain, J. S., Buxbaum, R. E., and Mankuta, D. (2017) Spontaneous first trimester miscarriage rates per woman among parous women with 1 or more pregnancies of 24 weeks or more, *BMC Pregnancy Childbirth*, **17**, 437, doi: 10.1186/s12884-017-1620-1.
 57. Keightley, P. D., and Otto, S. P. (2006) Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations, *Nature*, **443**, 89-92, doi: 10.1038/nature05049.
 58. Grieshop, K., Maurizio, P. L., Arnqvist, G., and Berger, D. (2021) Selection in males purges the mutation load on female fitness, *Evol. Lett.*, **5**, 328-343, doi: 10.1002/evl3.239.
 59. Felsenstein, J. (1974) The evolutionary advantage of recombination, *Genetics*, **78**, 737-756, doi: 10.1093/genetics/78.2.737.
 60. Luke, S., Cioffi-Revilla, C., Panait, L., Sullivan, K., and Balan, G. (2005) MASON: A multiagent simulation environment, *Simulation*, **81**, 517-527, doi: 10.1177/0037549705058073.
 61. Medawar, P. B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology: An Inaugural Lecture Delivered at University College, London, 6 December, 1951*, H. K. Lewis and Company, London.
 62. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, doi: 10.2307/2406060.
 63. Weismann, A. (1892) *Aufsätze über Vererbung und Verwandte Biologische Fragen*, G. Fischer, Jena.
 64. Weismann, A. (1884) *Ueber Leben und Tod: Eine Biologische Untersuchung*, G. Fischer, Jena.
 65. Weismann, A. (1904) *Vorträge über Deszendenztheorie; Band 2*, G. Fischer, Jena.
 66. Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., and Berezkin, G. V. (2015) Theories of aging: an ever-evolving field, *Acta Naturae*, **7**, 9-18.
 67. Kirkwood, T. B., and Cremer, T. (1982) Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress, *Hum. Genet.*, **60**, 101-121, doi: 10.1007/BF00569695.
 68. Libertini, G. (2015) Non-programmed versus programmed aging paradigm, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 56-68.
 69. Goldsmith, T. C. (2012) On the programmed/non-programmed aging controversy, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 729-732, doi: 10.1134/S000629791207005X.
 70. Olovnikov, A. M. (2003) The redusome hypothesis of aging and the control of biological time during individual development, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 2-33, doi: 10.1023/a:1022185100035.
 71. Schaible, R., Sussman, M., and Kramer, B. H. (2014) Aging and potential for self-renewal: hydra living in the age of aging – a mini-review, *Gerontology*, **60**, 548-556, doi: 10.1159/000360397.
 72. Chmielewski, P. (2017) Rethinking modern theories of ageing and their classification: the proximate mechanisms and the ultimate explanations, *Anthropol. Rev.*, **80**, 259-272, doi: 10.1515/anre-2017-0021.
 73. Voituren, Y., de Fraipont, M., Issartel, J., Guillaume, O., and Clobert, J. (2011) Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): A challenge for ageing mechanisms, *Biol. Lett.*, **7**, 105-107, doi: 10.1098/rsbl.2010.0539.
 74. Andrews, A. H., Tracey, D. M., and Dunn, M. R. (2009) Lead-radium dating of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*): validation of a centenarian life span, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **66**, 1130-1140, doi: 10.1139/f09-059.
 75. Nielsen, J., Hedeholm, R. B., Heinemeier, J., Bushnell, P. G., Christiansen, J. S., et al. (2016) Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*), *Science*, **353**, 702-704, doi: 10.1126/science.aaf1703.
 76. Goldsmith, T. C. (2016) Emerging programmed aging mechanisms and their medical implications, *Med. Hypotheses*, **86**, 92-96, doi: 10.1016/j.mehy.2015.10.015.
 77. Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., and Antoch, M. P. (2006) Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock, *Genes Dev.*, **20**, 1868-1873, doi: 10.1101/gad.1432206.
 78. Khapre, R. V., Kondratova, A. A., Susova, O., and Kondratov, R. V. (2011) Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence *in vivo*, *Cell Cycle*, **10**, 4162-4169, doi: 10.4161/cc.10.23.18381.
 79. Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., and Sassone-Corsi, P. (2009) Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1, *Science*, **324**, 654-657, doi: 10.1126/science.1170803.
 80. Bonaconsa, M., Malpeli, G., Montaruli, A., Carandente, F., Grassi-Zucconi, G., et al. (2014) Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice, *Exp. Gerontol.*, **55**, 70-79, doi: 10.1016/j.exger.2014.03.011.
 81. Hood, S., and Amir, S. (2017) The aging clock: Circadian rhythms and later life, *J. Clin. Invest.*, **127**, 437-446, doi: 10.1172/JCI90328.
 82. Vallee, A., Lecarpentier, Y., and Vallee, J. N. (2019) Curcumin: a therapeutic strategy in cancers by inhibiting the canonical WNT/beta-catenin pathway, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 323, doi: 10.1186/s13046-019-1320-y.
 83. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., et al. (2021) A Crosstalk between the biorhythms and gatekeepers of longevity: Dual role of glycogen synthase kinase-3, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 433-448, doi: 10.1134/S0006297921040052.
 84. Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., et al. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi: 10.1073/pnas.1417566112.

85. Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., et al. (2018) Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E8460-E8468, doi: 10.1073/pnas.1800431115.
86. Wible, R. S., Ramanathan, C., Sutter, C. H., Olesen, K. M., Kensler, T. W., et al. (2018) NRF2 regulates core and stabilizing circadian clock loops, coupling redox and timekeeping in *Mus musculus*, *Elife*, **7**, e31656, doi: 10.7554/eLife.31656.
87. Dubrovsky, Y. V., Samsa, W. E., and Kondratov, R. V. (2010) Deficiency of circadian protein CLOCK reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice, *Aging (Albany NY)*, **2**, 936-944, doi: 10.18632/aging.100241.
88. Ulgherait, M., Chen, A., McAllister, S. F., Kim, H. X., Delventhal, R., et al. (2020) Circadian regulation of mitochondrial uncoupling and lifespan, *Nat. Commun.*, **11**, 1927, doi: 10.1038/s41467-020-15617-x.
89. Kucerova, L., Kubrak, O. I., Bengtsson, J. M., Strnad, H., Nylin, S., et al. (2016) Slowed aging during reproductive dormancy is reflected in genome-wide transcriptome changes in *Drosophila melanogaster*, *BMC Genomics*, **17**, 50, doi: 10.1186/s12864-016-2383-1.
90. McCay, C. M., Crowell, M. F., and Maynard, L. A. (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935, *Nutrition*, **5**, 63-79, doi: 10.1093/jn/10.1.63.
91. Bauer, J., Antosh, M., Chang, C., Schorl, C., Kolli, S., et al. (2010) Comparative transcriptional profiling identifies takeout as a gene that regulates life span, *Aging (Albany NY)*, **2**, 298-310, doi: 10.18632/aging.100146.
92. Patel, S. A., Velingkaar, N., Makwana, K., Chaudhari, A., and Kondratov, R. (2016) Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms, *Sci. Rep.*, **6**, 25970, doi: 10.1038/srep25970.
93. Sato, S., Solanas, G., Peixoto, F. O., Bee, L., Symeonidi, A., et al. (2017) Circadian reprogramming in the liver identifies metabolic pathways of aging, *Cell*, **170**, 664-677.e11, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.042.
94. Schumacher, A. (2009) *An Epigenetic Clock: Anticorrelation & DNA Methylation as Biomarker for Aging*, doi: 10.13140/RG.2.2.12457.83042.
95. Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sanchez, F. J., Sinsheimer, J. S., et al. (2011) Epigenetic predictor of age, *PLoS One*, **6**, e14821, doi: 10.1371/journal.pone.0014821.
96. Oh, G., Ebrahimi, S., Carlucci, M., Zhang, A., Nair, A., et al. (2018) Cytosine modifications exhibit circadian oscillations that are involved in epigenetic diversity and aging, *Nat. Commun.*, **9**, 644, doi: 10.1038/s41467-018-03073-7.
97. Yi, S. J., and Kim, K. (2020) New Insights into the role of histone changes in aging, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8241, doi: 10.3390/ijms21218241.
98. Zarse, K., Terao, T., Tian, J., Iwata, N., Ishii, N., et al. (2011) Low-dose lithium uptake promotes longevity in humans and metazoans, *Eur. J. Nutr.*, **50**, 387-389, doi: 10.1007/s00394-011-0171-x.
99. Castillo-Quan, J. I., Li, L., Kinghorn, K. J., Ivanov, D. K., Tain, L. S., et al. (2016) Lithium promotes longevity through GSK3/NRF2-dependent hormesis, *Cell Rep.*, **15**, 638-650, doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.041.
100. Besing, R. C., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Rogers, C. O., Johnson, R. L., et al. (2015) Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus, *J. Biol. Rhythms*, **30**, 155-160, doi: 10.1177/0748730415573167.
101. Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., and Lazar, M. A. (2006) Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock, *Science*, **311**, 1002-1005, doi: 10.1126/science.1121613.
102. Noguchi, T., Lo, K., Diemer, T., and Welsh, D. K. (2016) Lithium effects on circadian rhythms in fibroblasts and suprachiasmatic nucleus slices from Cry knockout mice, *Neurosci. Lett.*, **619**, 49-53, doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.030.
103. Evason, K., Collins, J. J., Huang, C., Hughes, S., and Kornfeld, K. (2008) Valproic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan, *Aging Cell*, **7**, 305-317, doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00375.x.
104. Johansson, A. S., Brask, J., Owe-Larsson, B., Hetta, J., and Lundkvist, G. B. (2011) Valproic acid phase shifts the rhythmic expression of Period2::Luciferase, *J. Biol. Rhythms*, **26**, 541-551, doi: 10.1177/0748730411419775.
105. Griggs, C. A., Malm, S. W., Jaime-Frias, R., and Smith, C. L. (2018) Valproic acid disrupts the oscillatory expression of core circadian rhythm transcription factors, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **339**, 110-120, doi: 10.1016/j.taap.2017.12.005.
106. Tang, Y., and Cheng, L. (2017) Cocktail of chemical compounds robustly promoting cell reprogramming protects liver against acute injury, *Protein Cell*, **8**, 273-283, doi: 10.1007/s13238-017-0373-y.
107. Zmijewski, J. W., and Jope, R. S. (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts, *Aging Cell*, **3**, 309-317, doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00117.x.
108. Zhai, Y., Chen, X., Yu, D., Li, T., Cui, J., et al. (2015) Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the induction of pluripotency in mouse fibroblasts by suppressing reprogramming-induced senescence stress, *Exp. Cell Res.*, **337**, 61-67, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.003.
109. Leng, Y., Liang, M. H., Ren, M., Marinova, Z., Leeds, P., et al. (2008) Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition, *J. Neurosci.*, **28**, 2576-2588, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5467-07.2008.
110. Wu, S., Zheng, S. D., Huang, H. L., Yan, L. C., Yin, X. F., et al. (2013) Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin, *J. Biol. Chem.*, **288**, 35500-35510, doi: 10.1074/jbc.M113.479865.
111. Wakayama, S., Kohda, T., Obokata, H., Tokoro, M., Li, C., et al. (2013) Successful serial recloning in the mouse over multiple generations, *Cell Stem Cell*, **12**, 293-297, doi: 10.1016/j.stem.2013.01.005.
112. Cao, R., Li, A., Cho, H. Y., Lee, B., and Obrietan, K. (2010) Mammalian target of rapamycin signaling modulates photic entrainment of the suprachiasmatic circadian clock, *J. Neurosci.*, **30**, 6302-6314, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5482-09.2010.
113. Chaves, I., van der Horst, G. T., 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.
114. Lee, Y., and Kim, E. K. (2013) AMP-activated protein kinase as a key molecular link between metabolism and clockwork, *Exp. Mol. Med.*, **45**, e33, doi: 10.1038/emmm.2013.65.
115. Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., DiTacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., et al. (2009) AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation, *Science*, **326**, 437-440, doi: 10.1126/science.1172156.
116. Brown-Borg, H. M., Borg, K. E., Meliska, C. J., and Bartke, A. (1996) Dwarf mice and the ageing process, *Nature*, **384**, 33, doi: 10.1038/384033a0.

117. Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L., et al. (2013) Metformin improves healthspan and lifespan in mice, *Nat. Commun.*, **4**, 2192, doi: 10.1038/ncomms3192.
118. Stein-Behrens, B. A., and Sapolsky, R. M. (1992) Stress, glucocorticoids, and aging, *Aging (Milano)*, **4**, 197-210, doi: 10.1007/BF03324092.
119. Dracott, B. N., and Smith, C. E. (1979) Hydrocortisone and the antibody response in mice. I. Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes, *Immunology*, **38**, 429-435.
120. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., et al. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **908**, 244-254, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.
121. De Jesus, E. G., and Hirano, T. (1992) Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **85**, 55-61, doi: 10.1016/0016-6480(92)90171-f.
122. Atwood, C. S., Hayashi, K., Meethal, S. V., Gonzales, T., and Bowen, R. L. (2017) Does the degree of endocrine dyscrasia post-reproduction dictate post-reproductive lifespan? Lessons from semelparous and iteroparous species, *Geroscience*, **39**, 103-116, doi: 10.1007/s11357-016-9955-5.
123. Jeffries, K. M., Hinch, S. G., Donaldson, M. R., Gale, M. K., Burt, J. M., et al. (2011) Temporal changes in blood variables during final maturation and senescence in male sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*: reduced osmoregulatory ability can predict mortality, *J. Fish Biol.*, **79**, 449-465, doi: 10.1111/j.1095-8649.2011.03042.x.
124. Poskitt, D. C., Barnett, J., Duffey, K., Kimpton, W. G., and Muller, H. K. (1984) Involution of the thymus in marsupial mice, *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 483-488, doi: 10.1016/0145-305x(84)90056-9.
125. McQuillan, H. J., Lokman, P. M., and Young, G. (2003) Effects of sex steroids, sex, and sexual maturity on cortisol production: An *in vitro* comparison of chinook salmon and rainbow trout interrenals, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **133**, 154-163, doi: 10.1016/s0016-6480(03)00163-1.
126. Matos, L., Gouveia, A., and Almeida, H. (2012) Copper ability to induce premature senescence in human fibroblasts, *Age (Dordr)*, **34**, 783-794, doi: 10.1007/s11357-011-9276-7.

HOW JUSTIFIED IS THE ASSUMPTION OF PROGRAMMED AGING IN REMINISCENCE OF WEISMANN'S THEORIES?

Review

P. R. Winterhalter* and A. Simm

Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany; E-mail: winterhalter.patrick@gmail.com

Theories about the benefits of death and the resulting increased likelihood of programmed aging are controversial, advocated only by a minority. The extent to which their assumptions might be justified should be investigated. To this end, various approaches to the possible utility or origin were considered, particularly potential benefits of the faster generational change caused by possible evolutionary compound interest. Reference was made to the thinking of Weismann, the father of regulated aging theories, who advocated non-adaptive concepts at the end of his career. In a thought experiment, circadian rhythms are discussed as a possible molecular source of aging regulation.

Keywords: August Weismann, aging theory, programmed aging, semelparity, MASON model, circadian rhythm, clock genes

ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ И ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ ИСТОРИИ БИОХИМИИ 2022 г.*

DOI: 10.31857/S0320972522010109

125 лет — создание перекисной теории медленного окисления и клеточного дыхания (А.Н. Бах, 1897). Соч.: «О роли перекисей в процессах медленного окисления», ЖРФХО, **29**, 373, 1897.

125 лет — установление химической структуры гемма и доказательство родства гемоглобина и хлорофилла (W.M. Nencki, 1897).

125 лет — синтезирование физиологически активных производных пурина — кофеина, теобромбина, ксантина, гуанина, аденина (E. Fisher, 1897).

100 лет — открытие витамина Е (Н.М. Evans, 1922).

100 лет — открытие фермента лизоцима (A. Fleming, 1922).

100 лет — открытие антирахитического действия витамина Д (E.V. McCallum, 1922).

9 января — 100 лет со дня рождения Хара Гобинда Кораны (Хораны) (H.G. Khorana, 1922–2011), американского биохимика, индийца по происхождению, академика Национальной АН США (1966), иностранного члена АН СССР (1971). Наиболее известны его работы в области синтеза коферментов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Одним из первых изучил химическую природу нуклеиновой кислоты. Синтезировал ген, кодирующий аланиновую транспортную РНК (1967–1970). За расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белка удостоен Нобелевской премии (1968, совместно с др.).

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.

27 января — 175 лет со дня рождения Маркела (Марцелия) Вильгельмовича Ненцкого (M. Nencki, 1847–1901), отечественного биохимика, микробиолога, поляка по происхождению. С 1891 г. жил и работал в Петербурге, где организовал и возглавил химический отдел Института экспериментальной медицины. Внёс вклад в изучение биохимической роли различных классов органических соединений в животном организме. Работая вместе с И.П. Павловым в Петербурге,

выявил важную роль печени в нейтрализации аммиака и образовании мочевины. Осуществил синтез индиго (из индола), получил чистый гемин из крови, установил его элементарную формулу и показал общность структурных элементов гемоглобина и хлорофилла. Его имя присвоено Институту экспериментальной биологии в Варшаве.

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.

3 февраля — 100 лет со дня смерти Владимира Ивановича Палладина (1859–1922, род. в Москве), русского ботаника и биохимика, академика Петербургской АН. Ученик К.А. Тимирязева и И.Н. Горожанкина. Один из создателей теории дыхания растений как совокупности ферментативных процессов, осуществляемых системой оксидаз и дегидрогеназ. Его труды легли в основу современной теории биологического окисления. Ряд работ посвящён изучению процессов образования и координации действий ферментов. Создал отечественную школу физиологов и биохимиков растений.

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.

14 мая — 150 лет со дня рождения Михаила Семеновича Цвета (1872–1919, род. в Италии), русского ботаника, физиолога и биохимика растений. В 1897–1902 гг. работал в Петербургской биологической лаборатории, основанной П.Ф. Лесгафтом. Основные научные работы посвящены изучению пигментов растений и разработке методов их исследования. Открыл (1903) метод хроматографического адсорбционного анализа, широко используемый в биохимических, клинико-диагностических, фармацевтических, санитарно-гигиенических исследованиях.

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.; Сенченкова Е.М., М.С. Цвет, Москва, 1973.

16 мая — 75 лет со дня смерти Фредерика Гоуланда Гопкинса (Хопкинса) (F.G. Hopkins, 1861–1947), британского биохимика. Разработал титриметрический метод определения мочевой кислоты (1891–1893). Открыл и

* Составители: ведущий научный сотрудник, к.и.н. Егорышева И.В., старший научный сотрудник, к.и.н. Е.В. Шерстнева (Отдел истории медицины и здравоохранения ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко»); электронная почта: otdelistorii@rambler.ru

выделил триптофан (1903, совместно с S.W. Cole). Выделил, изучил структуру и свойства глутатиона и его роль в биологическом окислении ряда соединений (1921–1923). За исследования в области витаминов, стимулирующих рост, удостоен Нобелевской премии (1929, совместно с Х. Эйкманом).

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.

19 июня — 125 лет со дня рождения Сирила Нормана Хиншелвуда (S.N. Hinshelwood, 1897–1967), британского биохимика, президента Лондонского Королевского общества (1955–1960), иностранного члена АН СССР (1958). Основные работы в области цепных реакций. Внёс вклад в исследования кинетики разложения неорганических и органических веществ, роста бактерий в различных средах, адаптации бактерий к среде, зависимости скорости роста клеток от содержания в окружающей среде углекислого газа, аминокислот и др. Автор классической работы «Химическая кинетика бактериальной клетки» (1946). Удостоен Нобелевской премии по химии (1956, совместно с Н.Н. Семёновым) за исследования в области механизма химических реакций.

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.; Чолаков В., Нобелевские премии, М., 1986.

20 июля — 125 лет со дня рождения Тадеуша Рейхштейна (T. Reichstein, 1897–1996), швейцарского биохимика, фармаколога, эндокринолога, члена Швейцарской академии медицины (1951), Лондонского королевского общества (1952). Внёс вклад в изучение строения и свойств сахаров, витаминов, стероидов, сердечных гликозидов, содержащихся в растениях. Впервые выделил (1937) и описал гидрокортизон и установил химическую структуру кортизона (1938). Одновременно с Э. Кендаллом и независимо от него выделил кортикостерон (1937) и осуществил его синтез (1944). За исследование гормонов коры надпочечников удостоен Нобелевской премии (1950, совместно с др.).

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.

22 июля — 100 лет со дня смерти Дзёкити Такамине (J. Takamine, 1854–1922), японского биохимика. Независимо от других получил (1901) в кристаллическом виде активное вещество мозговой части надпочечников и дал ему название «адреналин».

Соч.: The production of diastase by microscopical plants, Dantburry, 1898.

Лит.: Саксонов П.П. (1950) К истории открытия и изучения адреналина, *Фармако-*

логия и токсикология, **13**, 4, с. 62–64; Biograph. Lexikon hervorrag, Ärzte, Bd 2, Berlin-Wien, 1933; Obituary, *Lancet*, 1922, Aug, 5, 11, p. 303; БМЭ, 2-е изд.

13 августа — 150 лет со дня рождения Рихарда Вильштеттера (R. Willstätter, 1872–1942), немецкого химика-органика и биохимика, члена Прусской АН, иностранного члена АН СССР. Установил структурные формулы кокаина и атропина, природу хлорофилла, изучил структуру кровяного пигмента — гемина. Разработал и усовершенствовал метод очистки ферментов путём адсорбции. Существенную роль в разработке вопросов общей энзимологии сыграли его взгляды на двухкомпонентную природу ферментов. За исследования окрашивающих веществ растительного происхождения, главным образом хлорофилла, удостоен Нобелевской премии по химии (1915).

Соч. и лит.: БМЭ, 3-е изд.

18 августа — 90 лет со дня рождения Юрия Андреевича Владимирова (1932, род. в с. Ямашево, Канашского района, Чувашской АССР), российского биолога, академика РАН. Основположник медицинской биофизики в нашей стране. Труды посвящены исследованию флуоресценции и фосфоресценции белков, первичных фотохимических реакций в белках, изучению явления слабой хемилюминесценции в биологических системах, кинетики и механизма перекисного (свободно-радикального) окисления липидов. Сформулировал гипотезу о ведущей роли в клеточной патологии процессов нарушения барьерной функции мембран, связанных с перекисным окислением липидов, действием эндогенных фосфолипаз, адсорбцией белков и осмотическим растяжением мембран; внёс значительный вклад в разработку ряда люминесцентных методов, применяемых в биологии и медицине. Разработанные им методы, основанные на использовании сверхслабого свечения плазмы крови и флуоресцентных зондов, нашли применение при диагностике ряда воспалительных, иммунных, сердечно-сосудистых заболеваний.

Соч.: Биофотоника и свободные радикалы (2011) *Наука в России*, **4**, с. 4–11; *Успехи биологической химии*, 2009, **49**, с. 341–388 (совместно с др.); Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах (2007) *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, Приложение 2, с. 13–20 (совместно с др.); Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран

митохондрий, некроз и апоптоз (2002) *Биологические мембраны*, **19**, 5, с. 355–377.

Лит.: Академику Владимирову Юрию Андреевичу — 85 лет! <http://www.ras.ru/news/shownews.aspx?id=89d3b439-f091-45d7-a633-83642d773f5c>

23 августа — 125 лет со дня смерти Джона Коудри Кендрю (J.C. Kendrew, 1917–1997), британского биохимика, специалиста в области молекулярной биологии, члена Королевского общества. За открытие молекулярной структуры гемоглобина и миоглобина удостоен Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М.Ф. Perutz). Основатель и главный редактор «*Journal of Molecular Biology*».

Соч. и лит.: БСЭ, 3-е изд.

31 декабря — 50 лет со дня смерти Андрея Николаевича Белозерского (1905–1972, род. в Ташкенте), российского биохимика, академика АН СССР, вице-президента АН СССР (1971–1972). С 1946 по 1960 г. заведовал лабораторией Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР. С 1965 по 1972 г.

был директором созданной им межфакультетской лаборатории биоорганической химии при МГУ (ныне НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского). Исследовал химию и биохимию нуклеиновых кислот. В 1957 г. предсказал (совместно с А.С. Спириным) открытие информационной РНК. Ряд работ посвящён изучению состава и биохимических функций субструктур клеток микроорганизмов, строения и нуклеотидной последовательности молекул ДНК, биологической роли полифосфатов и др.

Соч.: Молекулярная биология — новая ступень познания природы, М., 1970; Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, *Избранные Труды*, М., 1976.

Лит.: см. БМЭ, 3-е изд.; А.Н. Белозерский (1973) *Биохимия*, **1**, с. 1–2; Мельгунов В.И. (1981) Об А.Н. Белозерском, *Биол. науки*, **10**, с. 107–112; Спирин А.С. (1985) Необычайный человек и учёный, *Вестник АН СССР*, **8**, с. 127–132.