

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 10, 2021

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| НIF-опосредованные механизмы взаимосвязи устойчивости к гипоксии и опухолевого роста (обзор)<br><i>Д.Ш. Джалилова, О.В. Макарова</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1403 |
| Влияние омепразола на остеобласты и остеокласты <i>in vivo</i> и в модели <i>in vitro</i> с использованием чешуи рыбы<br><i>M.I. Zanaty, A. Abdel-Moneim, Y. Kitani, T. Sekiguchi, N. Suzuki</i>                                                                                                                                                                                                                                                                | 1423 |
| Изменения экспрессии гена аполиipoproteина A-I в макрофагах человека при захвате ими окисленных липопротеинов низкой плотности<br><i>Е.В. Некрасова, Е.Е. Ларионова, К. Данько, Д.О. Кузьмина, В.С. Шавва, И.В. Кудрявцев, С.В. Орлов</i>                                                                                                                                                                                                                       | 1433 |
| Разработка платформы для получения рекомбинантных белков — компонентов эпитопных вакцин для профилактики COVID-19<br><i>А.С. Карягина, А.В. Громов, Т.М. Грунина, А.М. Лящук, А.В. Гришин, Н.В. Струкова, М.С. Генералова, З.М. Галушкина, Л.А. Соболева, О.Ю. Добрынина, Т.Н. Большакова, М.Е. Субботина, Е.А. Романовская-Романько, И.В. Красильников, Н.Б. Поляков, А.И. Соловьев, Д.А. Грумов, В.Г. Жуховицкий, Е.И. Рябова, В.В. Прокофьев, В.Г. Лунин</i> | 1449 |
| Нерешённые проблемы функционирования карбоангидраз в фотосинтезирующих клетках высших СЗ-растений (обзор)<br><i>Н.Н. Руденко, Б.Н. Иванов</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1464 |
| Гидропероксид-восстанавливающие ферментные системы в регуляции свободнорадикальных процессов (обзор)<br><i>М.Г. Шарапов, С.В. Гудков, В.З. Ланкин</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1479 |
| Модифицированные N-концевые фрагменты галанина: кардиопротекторные свойства и механизмы действия (обзор)<br><i>О.И. Писаренко, И.М. Студнева, О.М. Веселова</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1502 |
| Ранняя индукция генов рецепторов нейротрофинов и микроРНК в головном мозге мышей после пентилентетразол-индуцированной нервной активности<br><i>А.А. Шмакова, К.Д. Рысенкова, О.И. Ивашкина, А.М. Груздева, П.С. Климович, В.С. Попов, К.А. Рубина, К.В. Анохин, В.А. Ткачук, Е.В. Семина</i>                                                                                                                                                                   | 1513 |
| Влияние ограничения питания на старение: исправление проблем с «сенсорами питания» у постмитотических клеток? (обзор)<br><i>Г.В. Моргунова, Г.А. Шиловский, А.Н. Хохлов</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1531 |
| Связывание РНК <i>in vitro</i> серпинами растений<br><i>Е.А. Толстыко, Д.А. Чергинцев, О.А. Толичева, Д.С. Виноградова, А.Л. Коневега, С.Ю. Морозов, А.Г. Соловьев</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1550 |
| Ламин А как определяющий фактор механических свойств ядра в норме и при патологии (обзор)<br><i>Н.Л. Овсянникова, С.В. Лаврушкина, А.В. Иванова, Л.М. Мазина, О.А. Жиронкина, И.И. Киреев</i>                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1563 |
| Сравнительный анализ и идентификация дифференциально экспрессируемых микроРНК в гипоталамусе овец казахской породы, помещенных в различные фотопериодические условия<br><i>H. Yang, L. Fu, Q. Luo, L. Li, F. Zheng, X. Liu, Z. Zhao, Z. Wang, and H. Xu</i>                                                                                                                                                                                                     | 1578 |
| Биологическая роль и эволюционная история систем CRISPR-Cas Типа III (обзор)<br><i>М.В. Колесник, Я.В. Федорова, К.О. Корнеева, Д.Н. Артамонова, К.В. Северинов</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1592 |

# CONTENTS

Vol. 86, Publ. 10, 2021

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| HIF-Dependent Mechanisms of Relationship of Hypoxia Tolerance and Tumor Development (Review)<br><i>D. Sh. Dzhalilova and O. V. Makarova</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1403 |
| Effect of Omeprazole on Osteoblasts and Osteoclasts <i>in vivo</i> and in the <i>in vitro</i> Model Using Fish Scales<br><i>M. I. Zanaty, A. Abdel-Moneim, Y. Kitani, T. Sekiguchi, and N. Suzuki</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1423 |
| Regulation of the Apolipoprotein A-I Gene Expression in Human Macrophages by Oxidated Low Density Lipoprotein<br><i>E. V. Nekrasova, E. E. Larionova, K. Danko, D. O. Kuzmina, V. S. Shavva, I. V. Kudriavtsev, and S. V. Orlov</i>                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1433 |
| Development of a Platform for Producing Recombinant Protein Components of Epitope Vaccines for the Prevention of COVID-19<br><i>A. S. Karyagina, A. V. Gromov, T. M. Grunina, A. M. Lyaschuk, A. V. Grishin, N. V. Strukova, M. S. Generalova, Z. M. Galushkina, L. A. Soboleva, O. Yu. Dobrinina, T. N. Bolshakova, M. E. Subbotina, E. A. Romanovskaya-Romanko, I. V. Krasilnikov, N. B. Polyakov, A. I. Solovyev, D. A. Grumov, V. G. Zhukhovitsky, E. I. Ryabova, V. V. Prokofiev, and V. G. Lunin</i> | 1449 |
| Unsolved Problems of Carbonic Anhydrases Functioning in Photosynthetic Cells of Higher C3 Plants (Review)<br><i>N. N. Rudenko and B. N. Ivanov</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1464 |
| Hydroperoxide-Reducing Enzyme Systems in Regulation of Free-Radical Processes (Review)<br><i>M. G. Sharapov, S. V. Gudkov, and V. Z. Lankin</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1479 |
| Modified N-Terminal Fragments of Galanin: Cardioprotective Properties and Mechanisms of Action (Review)<br><i>O. I. Pisarenko, I. M. Studneva, and O. M. Veselova</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1502 |
| Early Induction of Neurotrophin Receptor and miRNA Genes in Mouse Brain after Pentilentetrazole-Induced Nervous Activity<br><i>A. A. Shmakova, K. D. Rysenkova, O. I. Ivashkina, A. M. Gruzdeva, P. S. Klimovich, V. S. Popov, K. A. Rubina, K. V. Anokhin, V. A. Tkachuk, and E. V. Semina</i>                                                                                                                                                                                                            | 1513 |
| Effect of Calorie Restriction on Aging: The Correction of Problems with Nutrient Sensors in Postmitotic Cells? (Review)<br><i>G. V. Morgunova, G. A. Shilovsky, and A. N. Khokhlov</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1531 |
| RNA Binding by Plant Serpins <i>in vitro</i><br><i>E. A. Tolstyko, D. A. Chergintsev, O. A. Tolicheva, D. S. Vinogradova, A. L. Konevega, S. Y. Morozov, and A. G. Solovyev</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1550 |
| Lamin A as a Determinant of Mechanical Properties of the Nucleus in Health and Disease (Review)<br><i>N. L. Ovsianikova, S. V. Lavrushkina, A. V. Ivanova, L. M. Mazina, O. A. Zhironkina, and I. I. Kireev</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1563 |
| Comparative Analysis and Identification of Differentially Expressed microRNAs in the Hypothalamus of Kazakh Sheep Exposed to Different Photoperiod Conditions<br><i>H. Yang, L. Fu, Q. Luo, L. Li, F. Zheng, X. Liu, Z. Zhao, Z. Wang, and H. Xu</i>                                                                                                                                                                                                                                                       | 1578 |
| Type III CRISPR-Cas Systems: The Dissection of the Most Complex Prokaryotic Immune System (Review)<br><i>M. V. Kolesnik, I. Fedorova, K. A. Karneyeva, D. N. Artamonova, and K. V. Severinov</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1592 |

УДК 616-006.04

## НIF-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОСВЯЗИ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ И ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

### Обзор

© 2021 Д.Ш. Джалилова\*, О.В. Макарова

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека,  
117418 Москва, Россия; электронная почта: julia193@mail.ru

Поступила в редакцию 01.03.2021

После доработки 02.07.2021

Принята к публикации 14.07.2021

Кислородная недостаточность является одним из ключевых патогенетических факторов, определяющих развитие и тяжесть течения многих заболеваний, в том числе воспалительных, инфекционных и опухолевых. Недостаток кислорода активирует в клетках сигнальный путь индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF (Hypoxia-Inducible Factor), который имеет три изоформы – HIF-1, HIF-2, HIF-3, регулирующие экспрессию нескольких тысяч генов. В процессе развития и прогрессии опухолей активация HIF стимулирует ангиогенез, способствует изменению метаболизма клеток, адгезии, способности к инвазии и метастазированию. Изоформы HIF могут играть противоположную роль в развитии воспалительных и опухолевых процессов. Организмы человека и лабораторных животных отличаются как по устойчивости к гипоксии, так и по уровням экспрессии HIF и зависимых от него генов, что может обуславливать предрасположенность к развитию определенных онкологических заболеваний. Так, частота развития опухолей различных гистогенетических типов варьирует у людей, проживающих в горах и на уровне моря. Однако, несмотря на ведущую роль гипоксии практически на всех этапах формирования опухолей, исходная устойчивость к недостатку кислорода не считается фактором предрасположенности к инициации опухолевого роста. В литературе представлено множество работ, в которых охарактеризован уровень локальной гипоксии в различных опухолях, и предлагаются принципиальные подходы к её нивелированию путём ингибирования HIF. Однако ингибиторы HIF, как правило, оказывают системное действие на организм, и при этом не учитывается исходная устойчивость организмов к гипоксии, а также уровень экспрессии HIF. В обзоре обобщены литературные данные о различных изоформах HIF и их роли в опухолевой прогрессии с экстраполяцией на организмы с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии, а также о распространённости опухолей различных типов у населения, проживающего в горной местности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** устойчивость к гипоксии, высокогорье, опухолевая прогрессия, HIF, ангиогенез.

DOI: 10.31857/S0320972521100018

### ВВЕДЕНИЕ

По данным литературы, гипоксия является одним из ключевых факторов, регулирующих развитие опухолей различных типов [1, 2]. Показано, что локальный недостаток кислорода в опухоли коррелирует с её агрессивностью, скоростью метастазирования и резистентностью к

терапии [2, 3]. Поэтому исследование молекулярных и биологических механизмов взаимосвязи гипоксии и опухолевого роста позволит определить мишени для разработки новых методов эффективной терапии.

Клеточный ответ на гипоксию реализуется через сигнальный путь транскрипционного фактора HIF (Hypoxia-Inducible Factor – гипоксией индуцируемый фактор) [2, 4, 5]. HIF является гетеродимером, состоящим из одной регулируемой кислородом изоформы  $\alpha$ -субъединицы (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  или HIF-3 $\alpha$ ) и конститутивно экспрессирующейся субъединицы HIF-1 $\beta$  (ARNT, Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator – ядерный транслокатор (переносчик) ароматических углеводородов) [4–6]. При достаточной концентрации кислорода синтезирующаяся *de novo* цитоплазматическая субъединица HIF- $\alpha$  регулируется гидроксигированием пролиновых остатков с помощью пролилгид-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; НАР – пролекарства, активируемые гипоксией; HIF – индуцируемый гипоксией фактор (Hypoxia-Inducible Factor); HSP – белок теплового шока; MCT1 – транспортер монокарбоксилата 1 (Monocarboxylate transporter 1); MCT4 – транспортер монокарбоксилата 4 (Monocarboxylate transporter 4); PHD – Proliferating Cell Hydroxylase Domain proteins; UV-B – ультрафиолет-B; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VHL – E3-убиквитинлигазный комплекс фон Хиппеля–Линдау (Von Hippel–Lindau).

\* Адресат для корреспонденции.

роксилаз (Prolyl Hydroxylase Domain proteins – PHD1, PHD2 и PHD3), что способствует протеасомной деградации HIF с помощью E3-убиквитинлигазного комплекса фон Хиппеля–Линдау (Von Hippel–Lindau, VHL) [7, 8]. Активность гидроксилаз зависит от содержания кислорода в тканях: при низкой концентрации или отсутствии  $O_2$  она подавляется, что приводит к уменьшению гидроксирования HIF- $\alpha$ . В результате субъединица HIF- $\alpha$  накапливается в цитоплазме клеток и затем транслоцируется в ядро, где димеризуется с HIF- $\beta$ -субъединицей. В ядре димер HIF- $\alpha/\beta$  взаимодействует с отвечающими на гипоксию элементами HRE (Hypoxia Response Elements), которые расположены в промоторах кислород-зависимых генов, кодирующих белки, вовлечённые в системную и клеточную адаптацию к гипоксии, такие как эритропоэтин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и др. [9, 10].

Охарактеризовано множество независимых от гипоксии механизмов стабилизации субъединиц HIF- $\alpha$  в условиях нормоксии. Это состояние называется псевдогипоксией и возникает из-за чувствительности пролилгидроксилаз не только к изменениям концентрации  $O_2$ , но и к содержанию активных форм кислорода (АФК), железа, аскорбата и промежуточных продуктов цикла Кребса [5, 11, 12]. При мутациях в генах, кодирующих белки, вовлечённые в цикл Кребса, происходит стабилизация субъединиц HIF- $\alpha$  путём ингибирования их гидроксирования [12]. Например, при мутациях в генах изоцитратдегидрогеназы-1/2 (*IDH1/2*), которые обнаружены более чем в 80% глиобластом, наблюдается активация HIF-1 $\alpha$  [13, 14]. Активацию HIF-1 $\alpha$  способен вызывать лактат путём подавления PHD-опосредованного гидроксирования пролина [15]. Повышение уровней сукцината и фумарата из-за мутаций в генах, кодирующих соответствующие ферменты, приводит к ингибированию пролилгидроксилаз и стабилизации HIF- $\alpha$  [12]. Показано, что повышение концентрации пирувата также вызывает псевдогипоксические состояния [16]. Активация HIF-1, опосредованная псевдогипоксией, является ключевым механизмом развития ряда миелодиспластических синдромов [11].

Кроме того, активация субъединицы HIF- $\alpha$  происходит при изменении содержания цитокинов и ростовых факторов, таких как IL-1 $\beta$ , трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$ , белок теплового шока HSP90 (Heat Shock Protein-90), активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, сигнальных путей PI3K/АКТ/mTOR, MAPK, и др. [9, 17–19]. Таким образом, активация HIF при опухолевой прогрессии может происходить

в результате воздействия множества факторов, что во многом определяет развитие и исход заболевания.

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF), регулирует многие клеточные и молекулярно-биологические механизмы развития опухолей, включая: ангиогенез [20, 21], поддержание популяции опухолевых стволовых клеток [22, 23], метаболическое репрограммирование [24, 25], регуляцию аутокринных факторов роста [26], эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [27–30], инвазию [31, 32], метастазирование [33–35], а также влияет на резистентность опухолей к лучевой терапии [36] и химиотерапии [37].

### РОЛЬ ГИПОКСИИ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

В процессе развития злокачественных опухолей условно выделяют этапы инициации, промоции и прогрессии [38–40]. Greten и Grivennikov [40] охарактеризовали два основных взаимозависимых события, происходящих при инициации опухолевого роста. Во-первых, клетка приобретает ряд генетических мутаций, и по мере увеличения их числа повышается вероятность образования опухоли. Клетки с ограниченным количеством мутаций могут стимулировать рост доброкачественных опухолей, а отдельные клетки с достаточным для автономного существования количеством мутаций образуют клон клеток злокачественных опухолей [41, 42]. Во-вторых, для дальнейшего развития опухолей необходима пролиферация трансформированных клонов. Происходящие в процессе развития опухолей мутации и активная пролиферация клеток приводят к развитию гипоксии и активации фактора HIF [2].

При различных опухолях HIF-зависимая экспрессия множества генов может быть увеличена вследствие либо генетических изменений, либо внутриопухолевой гипоксии. С увеличением активности HIF связаны как мутации, приводящие к нарушению функции опухолевых супрессоров (в первую очередь *VHL*), так и мутации, активирующие протоонкогены и различные сигнальные пути. На экспериментальных моделях и клиническом материале показано, что уровни HIF-1 $\alpha$  или HIF-2 $\alpha$  коррелируют с темпами роста опухоли, васкуляризацией и метастазированием [2]. Повышение активности HIF-1 при развитии опухолей происходит либо в результате уменьшения его убиквитинирования, либо – увеличения синтеза белка HIF-1. Например, подавление функции генов-супрес-

соров, таких как *p53* и *VHL*, уменьшает убиквитинирование HIF-1, в то время как активация сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, MEK/ERK и нарушение функционирования *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*) способствует увеличению синтеза белка HIF-1 [2, 43, 44]. Активация тирозинкиназ EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) и HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor) при раке простаты и молочной железы соответственно также увеличивает синтез HIF-1 $\alpha$ , как результат активации сигнального пути PI3K/AKT. Он стимулирует активность mTOR, который, в свою очередь, способствует трансляции мРНК HIF-1 $\alpha$  в белок [45, 46]. Таким образом, одним из последствий многих ключевых генетических изменений в опухолевых клетках является повышение активности HIF.

**Гипоксия, инициация развития опухолей, увеличение пролиферации клеток и их выживания.** Гипоксия играет ключевую роль в процессе инициации опухолей, т.к. множество генов, в том числе протоонкогенов и опухолевых супрессоров, контролируется HIF [9, 10, 47]. Koshiji et al. [48] показали, что HIF-1 приводит к генетической нестабильности посредством ограничения репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК путём ингибирования экспрессии генов *MSH2* (*MutS homolog 2*) и *MSH6* (*MutS homolog 6*). Установлено, что HIF также способствует активации протоонкогена *K-RAS* [49]. В процессе развития опухолей важную роль играют так называемые опухолевые стволовые клетки, которые были обнаружены в гипоксической микросреде ряда опухолей — рака пищевода, желудка, молочной железы, яичников и почек [22, 23, 50–53]. Опухолевые стволовые клетки более устойчивы к химио- и радиотерапии, чем не стволовые [51, 53]. Экспрессия HIF-1 и HIF-2 повышена в стволовых клетках многих опухолей, в частности злокачественной глиомы, рака молочной железы и миелобластах при остром миелоидном лейкозе. На экспериментальных моделях в системах *in vitro* и *in vivo* показано, что активация HIF поддерживает фенотип опухолевых стволовых клеток [23, 53, 54]. Иммуортализация опухолевых стволовых клеток зависит от регулируемого HIF повышения активности теломеразы TERT, факторов плюрипотентности (NANOG и OCT4 — Octamer Binding Protein 4), гликолитических ферментов глюкозо-фосфатизомеразы (GPI) и фосфоглицератмутаза (PGM), блокирующих клеточное старение [55–57]. Гипоксия способствует дифференцировке клеток рака поджелудочной железы в подобные стволовым клеткам фенотипы с высоким онкогенным потенциалом пу-

тём активации сигнального пути HIF-1 и Notch [58].

Опухолевые клетки, в отличие от нормальных, характеризуются увеличением скорости пролиферации и снижением скорости гибели из-за повышенной экспрессии секретируемых факторов роста или выживания. Опухолевые клетки экспрессируют родственные секретируемым факторам роста мембранные рецепторы, что приводит к аутокринной передаче сигналов. К факторам роста или выживания, которые кодируются регулируемые HIF генами и участвуют в аутокринной передаче сигналов, относятся: трансформирующий фактор роста- $\alpha$  (*TGFA*) при светлоклеточном раке почек [59]; инсулиноподобный фактор роста-2 (*IGF2*) и фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) при колоректальном раке, раке желудка и поджелудочной железы [60–62]; эндотелин 1 (*EDN1*) при раке молочной железы, простаты и яичников [63]; аденомедуллин при раке поджелудочной железы и простаты [64] и эритропоэтин (*EPO*) при раке молочной и предстательной железы, почек и меланоме [65]. Эти гены контролируют ключевые опухолевые процессы — инвазию, пролиферацию, ангиогенез и метастазирование.

**Гипоксия и изменение метаболизма опухолевых клеток.** В условиях нормоксии митохондрии поддерживают окислительное фосфорилирование на уровне, необходимом для продукции АТФ (аэробный метаболизм). Однако в условиях гипоксии метаболизм переключается на анаэробный гликолиз. В опухолевых клетках так же, как и в нормальных, активация HIF способствует адаптации к гипоксии, ангиогенезу и изменению метаболизма. Известно, что опухолевые клетки генерируют АТФ с помощью гликолиза даже в условиях нормального снабжения кислородом [66]. Отто Варбург (Warburg [67]) обнаружил, что даже при достаточном количестве кислорода раковые клетки по сравнению с нормальными потребляют намного больше глюкозы, использующейся для образования молочной кислоты. Это открытие получило название «аэробный гликолиз» или «эффект Варбурга». Варбург полагал, что изменение дыхания вызывает метаболические нарушения, и это способствует прогрессии опухолей. В дальнейшем было установлено, что некоторые гены, контролирующие онкогенез, такие как *RAS*, *c-MYC* и *p53*, участвуют в регуляции эффекта Варбурга [68]. Многие исследования показали, что HIF-1, являясь основным регулятором ответа на гипоксию как нормальных, так и опухолевых клеток, играет существенную роль в процессе аэробного гликолиза для обеспечения энергетических потребностей опухолевых клеток и предотвраще-

ния их повреждения гипоксическим стрессом [2, 25, 69].

HIF-1 опосредует экспрессию генов, кодирующих белки-переносчики глюкозы (*GLUT1*, *GLUT3*) и гликолитические ферменты (*ALDOA* — альдоза А, *ENO1* — енолаза 1, *GAPDH* — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, *HK1*, *HK2* — гексокиназа 1 и 2, *PFKL* — фосфофруктокиназа 1, *PGK1* — фосфоглицераткиназа 1, *PKM2* — пируваткиназа М2, *LDHA* — лактатдегидрогеназа А), которые превращают глюкозу в лактат [2, 47]. Аэробный гликолиз протекает быстрее, чем митохондриальное окислительное фосфорилирование. По сравнению с нормальными клетками поглощение глюкозы метастазирующими опухолевыми клетками столь значительно, что оно служит в клинике основой для скрининга процесса метастазирования злокачественных опухолей у онкологических больных. С этой целью пациентам вводят <sup>18</sup>F-фтордезоксиглюкозу, которая визуализируется с помощью позитронно-эмиссионной томографии [70]. Таким образом, HIF-1 за счёт усиления поглощения глюкозы и увеличения активности гликолитических ферментов стимулирует в опухолевых клетках гликолиз — малоэффективный, но быстрый способ получения энергии.

Активация HIF и зависимых генов в пролиферирующих опухолевых клетках способствует не только изменениям метаболизма, но и формированию особого микроокружения. Критическим эффектом усиленного поглощения глюкозы и активации гликолиза опухолевыми клетками является ацидоз межклеточного пространства в тканях опухоли. Опухолевые клетки способствуют снижению внеклеточного pH за счёт активации комплекса генов-мишеней HIF-1, кодирующих синтез белков плазматической мембраны, таких как транспортер монокарбоксилата 4 (MCT4), натрий-водородный антипортер (NHE-1) и карбоангидраза 9 (CA9) [71]. Уменьшение pH межклеточного пространства стимулирует активность металло- и других протеиназ, которые разрушают межклеточный матрикс и нарушают способность клеток к взаимодействию. Изменения метаболизма, активация гликолиза и формирование кислой среды способствуют пролиферации клеток и прогрессированию роста опухоли [71]. Показано, что повышение концентрации лактата во многих карциномах связано с увеличением риска метастазирования [72].

Основными компонентами микроокружения клеток опухоли являются кровеносные и лимфатические сосуды, фибробласты, иммунные клетки и внеклеточный матрикс [73]. Фибробласты опухолевой ткани (Cancer-Associated

Fibroblasts, CAF) являются одними из главных компонентов стромы, и они могут составлять до 80% среди всех клеток опухоли. На паракринную передачу сигналов между опухолевыми клетками и фибробластами влияет недостаток кислорода. При прогрессии рака простаты показано, что гипоксия стимулирует секрецию хемокина CXCL13 опухоль-ассоциированными миофибробластами [74]. Опухолевые клетки в условиях гипоксии могут секретировать паракринные сигнальные молекулы, которые способствуют репрограммированию клеток-предшественников в CAF [75], и HIF-1 регулирует некоторые из этих сигнальных молекул, такие как TGF- $\beta$ , bFGF (основной фактор роста фибробластов) и PDGFB (тромбоцитарный фактор роста В) [2, 26, 59].

По содержанию кислорода в разных зонах опухоли являются гетерогенными и имеют как аэробные, так и гипоксические участки. Опухолевые клетки, прилегающие к кровеносным сосудам, оксигенируются лучше, и в них выражен окислительный метаболизм, тогда как клетки, расположенные на расстоянии от кровеносных сосудов, оксигенированы недостаточно, и в них преобладает гликолиз. Показано существование «метаболического симбиоза» между опухолевыми клетками гипоксических и аэробных районов (рис. 1) [76]. В недостаточно оксигенированных клетках HIF-1 опосредует высокую экспрессию переносчиков глюкозы, гликолитических ферментов, включая LDHA и MCT4. Эти изменения в экспрессии указанных генов приводят к увеличению поглощения глюкозы, превращению её в лактат и удалению последнего из клетки. Напротив, хорошо оксигенированные клетки экспрессируют транспортер монокарбоксилата 1 (MCT1) и лактатдегидрогеназу В (LDHB), которые опосредуют поглощение лактата и его превращение в пируват, использующийся для окислительного фосфорилирования. Лактат, образующийся в результате гликолиза в гипоксических клетках, секретируется с помощью MCT4, захватывается аэробными опухолевыми клетками посредством MCT1 и с помощью LDHB превращается в пируват. Затем он используется для окислительного фосфорилирования аэробными опухолевыми клетками для образования АТФ. Благодаря этому механизму для метаболизма и выживания гипоксических опухолевых клеток остаётся больше глюкозы [76]. Внутриопухолевые гипоксические очаги, окружённые нормоксическими клетками, служат своеобразной площадкой для прогрессирования инфильтративного роста опухоли. Показано, что инвазия происходит именно из гипоксических зон опухоли с низким pH [77].

По сравнению с окружающими опухоль нормальными тканями парциальное давление кислорода в ней значительно ниже [78]. Поскольку разные органы и ткани человека в разной степени снабжаются кислородом, уровень гипоксии в опухолях может отличаться в зависимости от их гистогенеза (табл. 1). Например, при саркомах мягких тканей значение парциального давления кислорода менее 22 мм рт. ст. [79], тогда как в прогрессирующей плоскоклеточной карциноме головы и шеи показатель  $pO_2$  составляет менее 5 мм рт. ст. [80]. Опухоли с максимально низким значением парциального давления кислорода характеризуются высокой скоростью инвазии и метастазирования [1, 81]. Показано, что у пациенток, страдающих раком шейки матки, с парциальным давлением кислорода в опухоли меньше 10 мм рт. ст. (1% кислорода) при хирургическом лечении или радиотерапии длительность жизни значительно ниже, чем у пациенток с более высокой степенью оксигенации опухолей [82].

**Гипоксия и ангиогенез.** Опухолевые клетки претерпевают адаптивные и генетические изменения, которые позволяют им выживать и пролиферировать в гипоксической среде. В процессе развития и прогрессии опухолей из-за избыточной пролиферации клеток и недостаточного кровоснабжения возникает гипоксия, которая активирует ангиогенез, регулируемый HIF-зависимым фактором VEGF [2, 20, 88]. Кислородная недостаточность индуцирует нарушение баланса между продукцией проангиогенных и антиангиогенных факторов, что приводит к избыточному, быстрому и хаотичному формированию кровеносных сосудов со значительным увеличением их количества. Такие сосуды характеризуются тонкими стенками, разнообразием формы и размеров [2, 89]. HIF-1 контролирует

экспрессию нескольких генов, кодирующих ангиогенные факторы роста, включая VEGF, SDF1 (Stromal-Derived Factor 1), PGF (фактор роста плаценты), PDGFB и ангиопоэтин (ANGPT 1 и 2) [2, 20, 88].

Экспрессия HIF-1 и HIF-2 в эндотелиальных клетках по-разному влияет на васкуляризацию. В экспериментальных моделях ингибирование активности HIF-1 значительно подавляет васкуляризацию опухолей, в частности рака простаты [21, 90]. В то время как делеция гена *HIF1A* уменьшает васкуляризацию опухоли и её рост, делеция *HIF2A*, напротив, усиливает ангиогенез с образованием незрелых сосудов и увеличением степени гипоксии опухоли [91, 92].

**Гипоксия и метастазирование опухолей.** Опухолевая прогрессия связана с метастазированием, которое во многом определяется взаимодействием опухолевых клеток с микроокружением и включает процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [30]. HIF-1 регулирует процесс метастазирования опухолей, изменяя адгезию и подвижность опухолевых клеток и активируя процессы ЭМП. Индуцированный гипоксией ЭМП характеризуется уменьшением экспрессии генов, кодирующих белки, характерные для эпителия — E-кадгерин и  $\beta$ -катенин, и увеличением экспрессии генов, кодирующих белки мезенхимального фенотипа — N-кадгерин, виментин,  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) и хемокиновый рецептор CXCR4 [27, 28, 93]. HIF-1 способствует активации транскрипции генов, кодирующих репрессоры (ID2 — Inhibitor of Differentiation 2, SNAIL и SNAIL2 — Snail Family Transcriptional Repressor 1 и 2, TCF3 — Transcription Factor 3, ZEB1 и ZEB2 — Zinc Finger E-boxbinding Homeobox 1 и 2), которые блокируют экспрессию E-кадгерина и других белков, обеспечивающих клеточную адгезию и нор-

**Таблица 1.** Показатели парциального давления и содержания кислорода в опухолях человека различных локализаций и в нормальных тканях

| Локализация опухоли      | Медиана парциального давления в норме (мм рт. ст.)/% содержания кислорода | Медиана парциального давления кислорода в опухоли (мм рт. ст.)/% содержания кислорода | Ссылка  |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Мозг                     | 26,0/3,4                                                                  | 13,0/1,7                                                                              | [83]    |
| Рак лёгких               | 42,8/5,6                                                                  | 15,5/2,1                                                                              | [84]    |
| Рак молочной железы      | 52,0/6,8                                                                  | 10,0/1,3                                                                              | [83]    |
| Рак шейки матки          | 42,0/5,5                                                                  | 9,0/1,2                                                                               | [81–83] |
| Рак поджелудочной железы | 51,6/6,8                                                                  | 2,35/0,35                                                                             | [85]    |
| Рак простаты             | 28,10/3,65                                                                | 5,4/0,7                                                                               | [86]    |
| Меланома                 | 40,5/5,3                                                                  | 11,6/1,5                                                                              | [87]    |
| Саркома                  | 51,0/6,7                                                                  | 14,0/1,8                                                                              | [83]    |

мальную архитектуру эпителиальных тканей [27–29]. Кроме того, HIF-1 активирует экспрессию генов *TGFA* и виментина (*VIM*), которые способствуют изменению структуры цитоскелета и приобретению опухолевыми клетка-

ми мезенхимального фенотипа [59], а также ответственных за миграцию и способность к инвазии — матриксных металлопротеиназ *MMP1*, 2 и *MMP9*, *LOX* (*Lysyl Oxidase*), *TWIST* и протоонкогена *MET* [2, 32, 33]. Экспрессия *LOX* метастази-

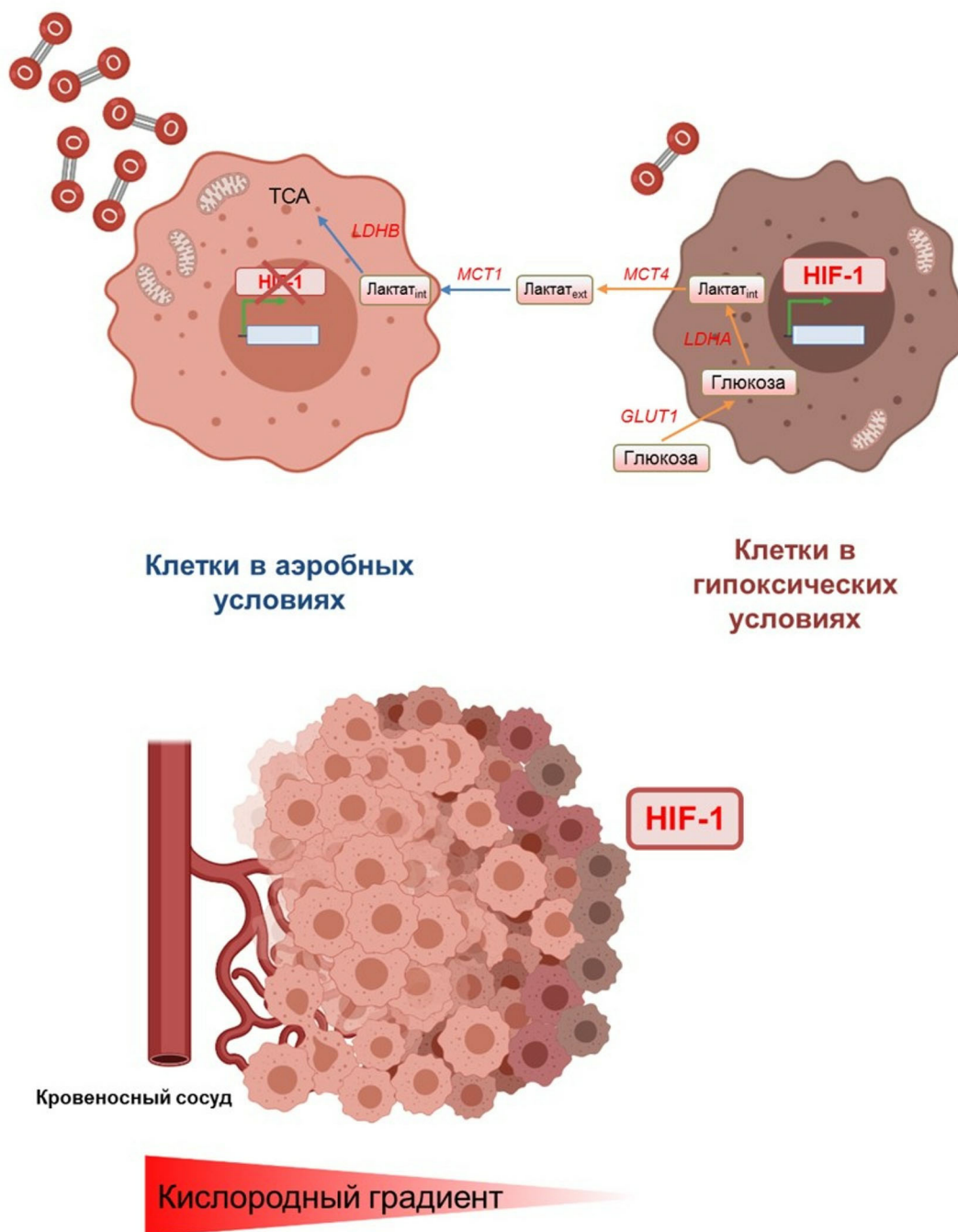


**Рис. 1.** Влияние градиента кислорода на развитие внутриопухолевой гетерогенности. Вокруг сосудов клетки хорошо оксигенируются, т.е. находятся в аэробных условиях, а клетки, расположенные на расстоянии от сосудов, находятся в гипоксических условиях, и в них активируется экспрессия HIF-1. В условиях гипоксии метаболизм клеток изменяется в сторону гликолиза, что приводит к избыточному образованию лактата. Лактат посредством MCT4 удаляется из гипоксических клеток и поглощается хорошо оксигенированными клетками через MCT1. Такое взаимодействие между клетками обеспечивает эффективное использование глюкозы, которое способствует прогрессии опухоли

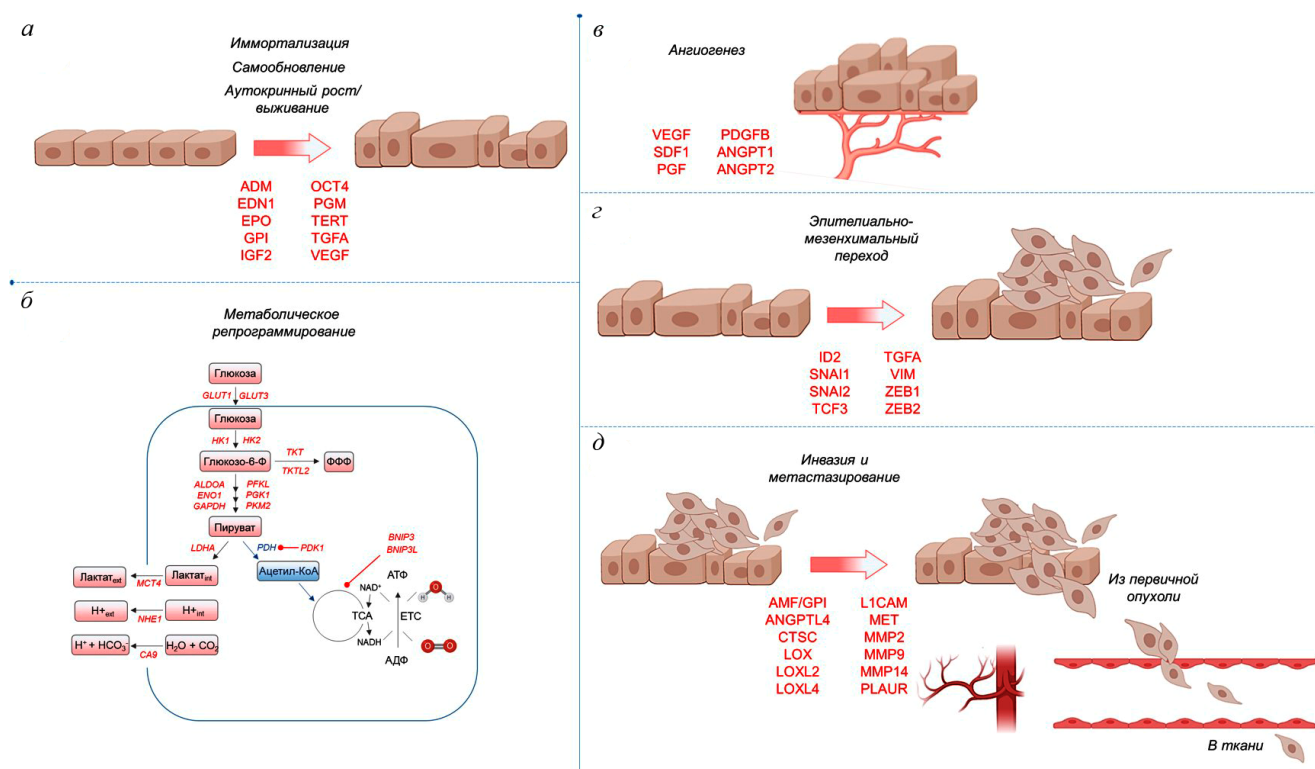


**Рис. 2.** Роль HIF на разных этапах развития опухолей. Красным выделены HIF-зависимые гены, кодирующие белки, которые принимают участие в ключевых этапах развития опухолей. *а* – Гены, контролирующие иммутизацию, самообновление стволовых клеток, аутокринный рост и выживание; *б* – гены, участвующие в метаболическом репрограммировании. Ферментативная активность пируватдегидрогеназы (PDH) ингибируется HIF-зависимой PDH-киназой 1 (PDK1), что блокирует превращение пирувата в ацетил-КоА для участия в цикле трикарбоновых кислот (TCA); *в* – HIF активирует гены, способствующие ангиогенезу в опухоли; *г* – гены, способствующие ЭМП; *д* – гены, контролирующие инвазию и метастазирование

рующими клетками приводит к повышению их способности образовывать колонии в тканях разных органов. HIF-1 активирует транскрипцию генов, кодирующих протеазы, которые разрушают (CTSC – Cathepsin C, MMP2, MMP9, PLAUR – Urokinase Plasminogen Activator Receptor) или ремоделируют (LOX, LOXL2, LOXL4) внеклеточный матрикс [2, 32–34].

Важным звеном в процессе метастазирования является регулируемая HIF-1 интраваскуляция – проникновение опухолевых клеток в кровеносные сосуды [94]. Показано, что при раке молочной железы HIF-1-индуцированный ANGPTL4 (Angiopoietin-Related Protein 4) уменьшает адгезию клеток сосудистого эндотелия, что способствует попаданию опухолевых клеток в просвет сосудов [34]. По данным Zhang et al. [35], L1CAM (L1 Cell Adhesion Molecule) и ANGPTL4 также снижают адгезию и инициируют экстравазацию опухолевых клеток в паренхиму органов с формированием метастазов. Роль HIF на разных этапах развития опухолей представлена на рис. 2.

## РОЛЬ ГИПОКСИИ И HIF В ОПУХОЛЯХ РАЗНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

По данным литературы, органы различаются по их чувствительности к гипоксии [95]. Наиболее чувствительными к гипоксии являются филогенетически более молодые отделы головного мозга – кора больших полушарий и мозжечка [96]. Кроме головного мозга, высокочувствительными к гипоксии органами являются сердце, лёгкие, почки и печень. По сравнению с другими органами сердце и печень в норме отличаются высоким потреблением O<sub>2</sub> и повышенным уровнем экспрессии HIF-1 [97]. К органам со средней чувствительностью к гипоксии относят поджелудочную железу и надпочечники, а к низкочувствительным – кости, хрящи, сухожилия и связки [96]. Известно, что даже в физиологических условиях внутри одной ткани наблюдается кислородный градиент и существуют гипоксические области, что необходимо для нормального функционирования кле-

ток [98]. Поэтому роль HIF в прогрессии опухоли во многом зависит от её локализации. Однако в литературе отсутствуют данные по взаимосвязи темпов развития опухоли и исходного кислородного статуса органа, в котором она образуется.

Повышенная экспрессия HIF-1 $\alpha$  обнаружена в клетках практически всех опухолей человека, что основано на иммуногистохимическом исследовании биопсийного материала [99, 100]. Экспрессия HIF-2 $\alpha$  повышена только в некоторых типах опухолей, таких как карцинома почки, немелкоклеточный рак лёгких, гемангиобластома мозжечка [101–103]. HIF-1 способствует прогрессии злокачественных опухолей молочной железы, и его ингибирование уменьшает метастазирование [104]. Кроме того, повышенная экспрессия HIF-1 $\alpha$  в карциномах толстой кишки, желудка, лёгких, кожи, яичника, поджелудочной железы и предстательной железы коррелирует с высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток [99]. По данным иммуногистохимических исследований, повышенная экспрессия HIF-1 $\alpha$  в опухолевых клетках сочетается с высокой степенью злокачественности, неблагоприятным прогнозом и резистентностью к разным видам терапии опухолей различных локализаций — головы и шеи, яичника и пищевода [99, 100].

Повышение экспрессии некоторых HIF-зависимых генов, в частности, *VEGF* в тканях глиомы, также является фактором неблагоприятного прогноза [105]. Показано, что клетки глиомы С6 отвечают на гипоксию активацией HIF-1 [106]. При прогрессии глиомы гипоксия способствует высокой продукции *VEGF*, который является ключевым регулятором ангиогенеза, и, в связи с этим, он играет важную роль в прогрессии опухолевого роста [105].

В некоторых тканях стабилизация HIF-1 оказывает супрессорное действие на рост опухоли. В частности, показано, что потеря экспрессии HIF-1 $\alpha$  способствует пролиферации клеток почечной карциномы [107]. Кроме того, при раке яичника повышенная экспрессия HIF-1 $\alpha$  коррелирует с интенсивностью апоптоза, а сочетание увеличенной гибели опухолевых клеток и высокой экспрессии HIF-1 $\alpha$  способствует выживаемости пациентов. Однако при раке яичника, при котором была повышена экспрессия и HIF-1 $\alpha$ , и мутантного p53, уровень апоптоза был низким, и это было связано с уменьшением длительности жизни пациентов [108]. На ранних стадиях рака пищевода у пациентов комбинация повышенной экспрессии HIF-1 $\alpha$  и BCL2 была связана с резистентностью к фотодинамической терапии [109]. Таким образом, эффект

повышенной экспрессии HIF-1 $\alpha$  зависит от локализации опухоли и наличия мутаций в генах, которые влияют на баланс проапоптотических и антиапоптотических факторов.

Установлено, что различные изоформы HIF, HIF-1 и HIF-2, могут играть разную роль в прогрессии опухолей. На мышинной модели немелкоклеточного рака лёгких (NSCLC) показано, что ингибирование HIF-2 $\alpha$  способствует пролиферации опухолевых клеток, а снижение активности HIF-1 $\alpha$  не влияет на онкогенез [110]. При анализе выживаемости пациентов с NSCLC показано, что повышенная экспрессия HIF-2 $\alpha$  статистически значимо связана с неблагоприятным прогнозом, а экспрессия HIF-1 $\alpha$  такого влияния не оказывает [103]. На модели рака толстой кишки, ассоциированного с хроническим колитом, установлено, что увеличение экспрессии HIF-1 в клетках кишечного эпителия не приводит к прогрессии опухолей. Опосредованное HIF-2 $\alpha$  воспаление способствует развитию опухолей ободочной кишки, а активация HIF-2 $\alpha$  при остром колите обуславливает тяжёлое течение заболевания [111].

Противоречивые данные о роли HIF и его субъединиц в прогрессии опухолей разных локализаций, вероятно, обусловлены комплексом взаимодействий множества факторов, активации и супрессии тех или иных генов при развитии каждой конкретной опухоли. Поэтому необходимы дальнейшие исследования роли HIF в прогрессии опухолей различной локализации, степени дифференцировки и гистогенеза с учётом исходного кислородного статуса ткани.

### **ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ, ОСНОВАННЫЕ НА КОРРЕКЦИИ ГИПОКСИИ**

Терапевтические подходы к коррекции гипоксии в опухолях основаны на увеличении их оксигенации или снижении потребления кислорода клетками. Для уменьшения степени гипоксии в опухолях были предложены такие методы, как гипербарическая оксигенация, гипертермия и дыхание карбогеном в сочетании с введением никотинамида. Эти методы, несмотря на их эффективность, не нашли широкого применения в онкологии в связи с высокой стоимостью, техническими сложностями их использования и побочными реакциями [112, 113].

В последние десятилетия интенсивно развивается направление по фармакологической коррекции гипоксии в опухолях. С этой целью используются лекарственные средства, направленные на ингибирование HIF, который являет-

ся главным регулятором экспрессии генов в гипоксических клетках.

Множество химических веществ и применяемых лекарственных средств способны ингибировать HIF через различные молекулярные механизмы, в частности, через уменьшение экспрессии мРНК, синтеза белка, димеризации HIF-1 $\alpha$ - и HIF-1 $\beta$ -субъединиц, увеличение деградации HIF-1 $\alpha$  и активности пролилгидроксилаз, уменьшение связывания с ДНК и др. (табл. 2). Существует две основные категории ингибиторов HIF: прямые ингибиторы, влияющие на экспрессию или функционирование молекул HIF, и непрямые, регулирующие другие молекулы, которые опосредованно влияют на HIF. Многие из потенциальных ингибито-

ров HIF в настоящее время проходят клинические испытания [114].

Следует отметить, что стратегия использования ингибиторов HIF-1 в онкологии может оказать неблагоприятное воздействие на течение сопутствующих заболеваний, при которых, напротив, необходим высокий уровень экспрессии HIF-1 — ишемии, анемии и др. [126]. В частности, при ишемической болезни сердца и ишемическом инсульте HIF-1-зависимое повышение экспрессии VEGF индуцирует образование новых кровеносных сосудов в области ишемии, усиливает кровоток и кислородное обеспечение, тем самым уменьшая ишемию [127]. При лечении, например анемии, связанной с хроническим гломерулонефритом, необходимо повыше-

**Таблица 2.** Ингибиторы HIF при терапии опухолей

| Механизм действия                                                        | Препарат                     | Эффекты терапии                                                                                                                                                                                        | Ссылки |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Уменьшение образования HIF-1 $\alpha$ :<br>ингибирование экспрессии мРНК | EZN-2968                     | снижает темпы роста опухолей                                                                                                                                                                           | [115]  |
|                                                                          | PX-478                       | снижает экспрессию VEGF; вызывает регрессию опухоли и задерживает её рост                                                                                                                              | [116]  |
|                                                                          | аминофлавоны                 | способствует апоптозу опухолевых клеток; снижает пролиферативную активность                                                                                                                            | [117]  |
|                                                                          | EZN-2208                     | уменьшает прогрессию опухолей; увеличивает выживаемость                                                                                                                                                | [118]  |
|                                                                          | топотекан                    | уменьшает рост опухолей и ангиогенез                                                                                                                                                                   | [119]  |
|                                                                          | сердечные гликозиды          | уменьшают рост опухолей                                                                                                                                                                                | [120]  |
|                                                                          | KC7F2                        | предотвращает активацию MMP2, карбоангидразы 9, эндотелина 1 и енолазы 1; супрессирует гены, связанные с ЭМП                                                                                           | [121]  |
| ингибирование синтеза белка                                              | 2-метоксиэстрадиол           | разрушает цитоскелет и ингибирует ангиогенез                                                                                                                                                           | [122]  |
|                                                                          | гелданамицин                 | уменьшает ангиогенез и инвазию клеток                                                                                                                                                                  | [123]  |
|                                                                          | ганетеспиб                   | уменьшает рост первичной опухоли, васкуляризацию и инвазию в окружающие ткани, а также метастазирование в лимфатические узлы и легкие; уменьшает число опухолевых стволовых клеток в первичной опухоли | [124]  |
| Ингибирование димеризации HIF- $\alpha$ /HIF- $\beta$                    | акрифлавин                   | уменьшает рост опухоли, ингибирует внутриопухолевую экспрессию ангиогенных факторов и васкуляризацию опухоли                                                                                           | [90]   |
| Ингибирование связывания с ДНК                                           | эхиномицин                   | ингибирует рост и метастазирование опухолей                                                                                                                                                            | [125]  |
|                                                                          | доксорубицин<br>даунорубицин | уменьшают васкуляризацию опухолей и ангиогенез                                                                                                                                                         | [21]   |

ние активности HIF-1 и HIF-2 для увеличения синтеза эритропоэтина [128]. С этой целью используются многочисленные ингибиторы пролилгидроксилаз, которые способствуют разрушению субъединицы HIF- $\alpha$  в протеасоме. Кроме того, на экспериментальных моделях показано, что повышение экспрессии HIF-1 способствует уменьшению тяжести течения воспалительных заболеваний кишечника [129].

Противоопухолевые химиотерапевтические препараты при внутривенном введении оказывают не только локальный эффект (на опухолевые клетки), но и системное действие, что может снижать эффективность лечения и вызывать побочные эффекты. Однако терапевтический эффект противоопухолевых лекарственных средств в зависимости от исходной устойчивости организма к гипоксии и уровня экспрессии HIF не исследован. Эффективность лекарственных средств может быть не одинаковой у организмов с разной устойчивостью к гипоксии. В частности, эффект терапии антигипоксантами более выражен у низкоустойчивых к гипоксии животных [130].

Одним из перспективных подходов к лечению опухолей с выраженной гипоксией стало использование молекул с повышенной токсичностью именно для гипоксических клеток. Пролекарства, активируемые гипоксией (HAP — Hypoxia-Activated Prodrugs) — это агенты, селективно активирующиеся в условиях недостатка кислорода, направленные на уничтожение гипоксических опухолевых клеток, которые устойчивы к традиционным методам лечения. HAP вводятся в неактивной форме, и они являются биологически инертными при нормоксии, но способны подвергаться ферментативному восстановлению оксидоредуктазами в условиях гипоксии с образованием биологически активных соединений, которые легко повторно окисляются в присутствии кислорода [131].

Первые исследования HAP были проведены группой А. С. Sartorelli из Йельского университета, которая показала, что митомицин С активировался преимущественно в условиях гипоксии и, таким образом, приобретал способность избирательно уничтожать гипоксические клетки [132].

На сегодняшний день была оценена эффективность некоторых HAP, включая порфирамицин, тирапазамин (SR4233), баноксантрон, эвофосфамид, PR-104 и тарлоксотиниб [133]. Эвофосфамид и тарлоксотиниб в настоящее время проходят клинические испытания.

Эвофосфамид (TH-302) показал высокую эффективность на этапе доклинических исследований, но она не подтвердилась при оценке в кли-

нических испытаниях фазы III, что, возможно, связано с тем, что не учитывался уровень внутриопухолевой гипоксии [134, 135]. Кроме того, эффективность пролекарств, действующих на опухолевые клетки в области гипоксии, может зависеть не только от степени локальной гипоксии в опухоли, но и от индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода всего организма.

В настоящее время оценку содержания кислорода в опухолях проводят главным образом с исследовательской целью, и для этого существуют несколько методов. Прямое измерение  $pO_2$  с помощью кислородного электрода, введенного в опухоль, было широко использовано для определения степени оксигенации солидных опухолей. Эта процедура инвазивная, что затрудняет выполнение повторных измерений. Кроме того, опухоли гетерогенны по степени гипоксии, а для работы с электродами требуется квалифицированный персонал [136]. Многообещающий метод, MPT с кислородным усилением (OE-MRI), который менее инвазивен, предложен O'Connor et al. [137].

Гипоксия и активация HIF играют ключевую роль в развитии резистентности опухолевых клеток к различным методам лечения. Основным механизмом химиорезистентности HIF является увеличение экспрессии белков-транспортеров (таких как Multidrug Resistance 1 Protein (MDR1), Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1) и Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)), которые снижают концентрацию химиотерапевтических агентов внутри опухолевых клеток, находящихся в условиях гипоксии. Лекарственные препараты, используемые при лечении рака молочной железы, такие как доксорубицин, паклитаксел и винкристин, являются субстратами для опосредованного MDR1 снижения концентрации, и активация HIF-1 увеличивает устойчивость опухолевых клеток к ним [138, 139].

Чувствительность к химиотерапии во многом зависит от интенсивности кровотока внутри опухолей, поэтому нерегулярность сосудистой сети в опухолях коррелирует с нарушением доставки химиотерапевтических агентов [140]. Кроме того, изменение градиента pH в результате гипоксии может нарушать активность pH-зависимых химиотерапевтических средств (доксорубицин и доцетаксел) и ДНК-алкилирующих агентов, таких как темозоломид, хлорамбуцил и ифосфамид. Другие связанные с HIF механизмы устойчивости к химиотерапии — это повышение аутофагии, изменение метаболизма клеток и ингибирование апоптоза.

Гипоксия в опухолях также способствует резистентности к лучевой терапии за счёт ряда

факторов, контролируемых HIF. В частности, обусловленная HIF-1 радиорезистентность клеток HeLa рака шейки матки в условиях гипоксии была связана со снижением экспрессии Bax и p53 и радиационно-индуцированного апоптоза [141]. Показано, что HIF-зависимое повышение экспрессии Human Epididymis Protein 4 (HE4) обуславливает высокую устойчивость клеток рака желудка к лучевой терапии [142], а эритропоэтин увеличивает выживаемость клеток глиомы после воздействия [143].

### РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ HIF И ИСХОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ГИПОКСИИ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ

Возникновение большинства опухолей связано с влиянием факторов окружающей среды и зависит от генетических особенностей организма [144]. Установлено, что развитие 95% опухолей связано с взаимодействием факторов внешней среды и генов и 5% — только генами [145]. Генетические факторы, влияющие на предрасположенность к развитию рака, включают редкие доминантные мутации, а также более распространённые генетические полиморфизмы, которые определяют индивидуальную реакцию на воздействие окружающей среды [145]. В частности, вариабельность в уровнях экспрессии или изоформах генов метаболизма, таких как P450, глутатион S-трансфераза (GST) и N-ацетилтрансфераза (NAT), а также HIF-1 $\alpha$  значительно влияет на индивидуальную реакцию на канцерогены. Показано, что люди отличаются значительной индивидуальной вариабельностью уровней экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-зависимых генов в лейкоцитах [146, 147]. У людей выявлено наличие полиморфизмов гена *HIF1A*, обеспечивающих высокий уровень его экспрессии. Один из наиболее исследованных полиморфизмов HIF-1 $\alpha$  — 1772 C>T (rs11549465 C>T, Pro582Ser). По сравнению с диким типом этот полиморфный вариант определяет увеличение транскрипционной активности HIF-1 $\alpha$  как в нормоксических, так и в гипоксических условиях [148]. Недавно было показано, что полиморфизм HIF-1 $\alpha$  rs11549465 C>T связан с увеличением риска развития опухолей [149].

Известно, что организмы человека и лабораторных животных отличаются по устойчивости к гипоксии, т.е. гипоксическое воздействие одной и той же степени тяжести вызывает разные реакции у особей одной популяции, одного возраста и пола [97, 150–158]. Однако, несмотря на важную роль гипоксии в процессах онкогенеза, практически на всех этапах формирования опу-

холей индивидуальная исходная устойчивость организма к гипоксии не рассматривается как фактор предрасположенности к инициации опухолевого роста. Gorr et al. [3] отмечают, что степень исходной устойчивости организма к кислородной недостаточности может также определять и уровень внутриопухолевой гипоксии.

В экспериментальных исследованиях выделены высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии лабораторные животные, у людей исследована чувствительность к острой горной болезни и высокогорному отёку лёгких [97, 150–158]. Устойчивость к гипоксии лабораторных животных определяют в барокамере по «времени жизни» на критической высоте — времени до принятия бокового положения. «Время жизни» высокоустойчивых к гипоксии животных обычно отличается от низкоустойчивых как минимум в 3 раза. В результате определения устойчивости к гипоксии в барокамере значительная доля приходится на среднеустойчивых животных (40–58%), доля высокоустойчивых животных колеблется от 20 до 42%, а низкоустойчивых — от 18 до 40% [97, 150, 151, 158].

По данным литературы, известно, что устойчивость к гипоксии связана с активностью ферментов антиоксидантной защиты [157]. Ферментативная система защиты от окислительного стресса более активна у людей, проживающих в высокогорных районах, что обусловлено постоянным воздействием гипоксии и образования АФК [157]. Показано, что в сердце у высокоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули после гипоксического воздействия уровень таких ферментов, как супероксиддисмутаза и каталаза, которые защищают клетки от окислительного стресса, выше по сравнению с низкоустойчивыми животными [150]. Экспрессия наиболее изученных белков теплового шока (HSP60, HSP70 и HSP90), стабилизирующих мембраны, в миокарде у высокоустойчивых к гипоксии крыс была значительно повышена, что свидетельствует об их способности переносить длительное воздействие дефицита O<sub>2</sub> и более эффективной адаптации [150, 153]. Полученные нами ранее данные [158] также свидетельствуют о том, что животные с разной устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у низкоустойчивых животных после гипоксической нагрузки повышалось содержание маркера окислительного стресса 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных мембран и увеличением уровня TGF- $\beta$ . В миокарде у низкоустойчивых к гипоксии крыс почти в 8 раз выше содержание малонового диальдегида, кото-

рый образуется при воздействии АФК и является одним из маркёров окислительного стресса [150]. Окислительный стресс играет ключевую роль в развитии опухолей. Показано, что интервальные воздействия гипоксии приводят к увеличению продукции АФК, что способствует выживанию и пролиферации опухолевых клеток [159]. По-видимому, организмы с разной устойчивостью к гипоксии могут быть в разной степени предрасположены к развитию опухолевых заболеваний, что, вероятно, во многом обусловлено различным уровнем окислительного стресса и степенью антиоксидантной защиты.

Тем не менее механизмы развития опухолевых заболеваний у организмов с разной устойчивостью к гипоксии недостаточно изучены. Важную роль, вероятно, играет экспрессия HIF-1, NF- $\kappa$ B и VEGF. В условиях нормоксии у чувствительных к высокогорному отёку лёгких людей содержание в сыворотке крови HIF-1 $\alpha$  выше, чем у устойчивых [156]. Показано, что высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные отличаются по многим параметрам, в том числе по содержанию HIF-1 $\alpha$  и VEGF: у низкоустойчивых к гипоксии крыс в нормоксических условиях уровень HIF-1 $\alpha$  в неокортексе в 1,7 раза выше, чем у высокоустойчивых [97, 150, 151]. Нами показано, что при системном воспалительном ответе более высокая экспрессия HIF-1 у низкоустойчивых к гипоксии животных сопровождается повышением экспрессии NF- $\kappa$ B и более тяжёлым течением заболевания [151]. На моделях острого и хронического колита также продемонстрировано, что течение этих заболеваний более тяжёлое у низкоустойчивых к гипоксии мышей [160, 161]. Учитывая роль HIF в регуляции множества генов, ответственных за различные процессы в организме, очевидно, что более высокая исходная экспрессия HIF-1 $\alpha$  у низкоустойчивых к гипоксии организмов может влиять как на процессы онкогенеза, так и на устойчивость к терапии различных видов рака. Однако уровни экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолях у организмов с разной устойчивостью к гипоксии в настоящее время не изучены.

Ранее нами показано [162], что прогрессия меланомы B16 была более выражена у низкоустойчивых к гипоксии мышей, что характеризовалось бóльшим объёмом первичного узла и относительной площади некрозов, высокими темпами пролиферации, оцениваемыми по митотическому индексу и числу Ki-67+ клеток, а также повышенной экспрессией VEGF в печени. Число гибнущих по механизму апоптоза каспаза 3-положительных клеток было выше у высокоустойчивых к гипоксии мышей. Экспрессия

HIF-1 $\alpha$  повышена во множестве типов опухолей человека, включая меланому [163, 164]. Конститутивная экспрессия HIF-1 $\alpha$  была продемонстрирована в клетках меланомы с помощью иммуногистохимического анализа, количественной ПЦР, вестерн-блота и иммунофлуоресцентного окрашивания культивируемых клеток [163, 164]. Экспрессия HIF-1 $\alpha$  у пациентов с меланомой была выявлена в большинстве опухолевых образцов (87,6%), но её уровень не коррелировал с прогнозом течения заболевания и длительностью жизни [163]. Показано, что увеличение экспрессии как HIF-1 $\alpha$ , так и HIF-2 $\alpha$  коррелирует с экспрессией VEGF в меланоме, однако более сильная взаимосвязь установлена для HIF-2 $\alpha$  с VEGF и неблагоприятным прогнозом [163]. Возможно, между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии организмами существуют также различия по экспрессии HIF-2 $\alpha$ , который является более критичным фактором в прогрессии меланомы, однако таких данных в литературе не представлено.

Представляют интерес данные по исследованиям устойчивых к гипоксии голых землекопов, которые живут в экстремальных условиях недостатка кислорода и способны выдерживать в среднем 250 секунд полной аноксии [165]. Долгое время считалось, что опухоли у них не развиваются, хотя недавно были зарегистрированы случаи нейроэндокринной карциномы желудка и подкожной аденокарциномы [166]. Возможно, высокая степень защиты от развития опухолей у голых землекопов зависит от особенностей метаболизма, экспрессии HIF-1 и выраженной антиоксидантной защиты [165, 167].

Таким образом, гипоксия играет ключевую роль на разных стадиях развития опухолей. Различная предрасположенность людей к развитию опухолей разных типов может быть обусловлена не только внешними и генетическими факторами, возрастом, полом, но и определяться индивидуальной устойчивостью к гипоксии и уровнем экспрессии различных изоформ фактора HIF. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования в этой области.

### **УСТОЙЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К РАЗВИТИЮ ОПУХОЛЕЙ У НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО В ВЫСОКОГОРНЫХ РАЙОНАХ**

Системная гипоксия оказывает влияние на частоту развития некоторых видов рака (табл. 3). Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что люди, населяющие высокогорные районы, имеют низкую смертность от

злокачественных опухолей. Адаптация к хроническому гипоксическому воздействию в условиях гор приводит к зависимым от гипоксии метаболическим изменениям, включая углеводный и липидный обмен. Люди, проживающие в условиях высокогорья, характеризуются сниженным уровнем глюкозы в крови [168], что может быть защитным фактором от связанного с гипергликемией увеличения риска развития опухолей [169]. Липиды необходимы для регуляции многих связанных с опухолями сигнальных путей, и высокая концентрация липидов в плазме связана с увеличением риска развития опухолей [170]. У жителей высокогорья обнаружены пониженные уровни жирных кислот в плазме крови, а также холестерина [171], что также определяет низкую заболеваемость и смертность от рака.

Хотя общая смертность от злокачественных опухолей отрицательно коррелирует с увеличением высоты [172–175], в зависимости от гистогенеза опухоли выявляется ряд особенностей. В то время как при лимфоме, раке молочной железы, пищевода, языка и полости рта или гортани показано снижение смертности в высокогорье, смертность от рака печени и шейки матки не различалась у людей, живущих на уровне моря и в высокогорье [172, 175]. Выявлено наличие обратной связи между уровнем заболеваемости и смертности от рака лёгких и высотой [174]. Закономерно, что заболеваемость и смертность от меланомы увеличивается на высоте из-за более высокого воздействия ультрафиолета-В (UV-B) [176]. Кроме того, заболеваемость опухолью каротидного тела, параганглиомой, увеличивается в высокогорье [177]. Высота считается

очень важным фактором среды при развитии рака желудка и влияет на его развитие как прямо, так и косвенно. Прямое влияние высоты на развитие рака желудка продемонстрировано в ряде работ: в Эквадоре в высокогорных провинциях смертность от рака желудка наиболее высокая [178, 179]. Высокая частота встречаемости рака желудка наблюдается в высокогорных районах Испании, Ирана, Китая и в Латинской Америке [178, 179]. Следует отметить, что, кроме высоты, на развитие рака желудка существенное влияние оказывает ряд других факторов — особенности питания и низкое содержание селена в почве в высокогорных районах [180].

Снижение или увеличение заболеваемости злокачественными опухолями той или иной локализации у населения, проживающего в высокогорных районах, помимо гипоксии, определяется и другими факторами окружающей среды. Среди факторов окружающей среды в условиях высокогорья в развитии некоторых типов рака обсуждается роль загрязнения воздуха, UV-B и связанного с ним синтеза витамина D. Предполагается, что снижение смертности от ряда опухолей (лимфомы, молочной железы, лёгких и других) в условиях гор может быть обусловлено повышенным UV-B-зависимым синтезом витамина D, однако для рака простаты не выявлено связи с высокогорьем и содержанием витамина D [174, 181]. Таким образом, защитная роль повышенных уровней витамина D в отношении развития рака и смертности возможна, но, вероятно, во многом зависит от локализации опухоли, поэтому необходимы дальнейшие исследования в этой области.

**Таблица 3.** Эпидемиологические данные о заболеваемости и смертности от разных опухолей у населения, проживающего в условиях гор

| Опухоль                                              | Эффект высокогорья                                           | Ссылка    |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| Лейкемия, опухоли лёгких, кишечника и молочных желёз | уменьшение смертности                                        | [172]     |
| Рак лёгких                                           | уменьшение заболеваемости и смертности                       | [174]     |
| Рак молочных желёз                                   | уменьшение заболеваемости                                    |           |
| Колоректальный рак и рак простаты                    | нет различий по заболеваемости                               |           |
| Опухоли языка, рта, пищевода, гортани                | уменьшение смертности                                        | [175]     |
| Меланома                                             | увеличение заболеваемости и смертности на высоте более 700 м | [176]     |
| Опухоль каротидного тела (параганглиома)             | увеличение заболеваемости                                    | [177]     |
| Рак желудка                                          | увеличение заболеваемости и смертности                       | [178–180] |
| Лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы             | уменьшение заболеваемости                                    | [182]     |
| Снижение общей смертности от рака на высоте          |                                                              | [172–175] |

В целом наиболее сильным фактором среды и адаптации на высоте является низкая доступность кислорода, и это может вносить наибольший вклад в смертность от злокачественных опухолей. Данные о том, что в условиях высокогорья в зависимости от содержания кислорода смертность от рака снижена, на первый взгляд, противоречат здравому смыслу, поскольку внутриопухолевая гипоксия сама по себе является фактором для роста опухоли и формированием её более агрессивного фенотипа [1, 81]. Следует отметить, что на высоте в связи с адаптацией организма включаются механизмы коррекции гипоксии, происходит активация HIF и увеличивается содержание гемоглобина в крови.

Таким образом, кислородная недостаточность и активация экспрессии HIF являются патогенетическими факторами развития опухолевых заболеваний. В процессе развития и прогрессии опухолей активация HIF стимулирует ангиогенез, способствует изменениям метаболизма клеток, адгезии, способности к инвазии и метастазированию. Различные изоформы HIF — HIF-1, HIF-2 и HIF-3 — могут играть противо-

положную роль в развитии опухолевого процесса. Организмы человека и лабораторных животных отличаются как по устойчивости к гипоксии, так и по уровням экспрессии изоформ HIF и его зависимых генов, что может обуславливать предрасположенность к развитию определенных онкологических заболеваний. В том числе частота развития опухолей различных типов варьирует у людей, проживающих в высокогорье и на уровне моря. Необходимы дальнейшие исследования роли гипоксии в формировании опухолей с учётом индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода.

**Финансирование.** Работа выполнена и финансировалась в рамках бюджетной темы № АААА-А19-119021490067-4.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Harris, A. L. (2002) Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 38–47, doi: 10.1038/nrc704.
- Semenza, G. L. (2010) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene*, **29**, 625–634, doi: 10.1038/onc.2009.441.
- Gorr, T. A., Wichmann, D., Hu, J., Hermes-Lima, M., Welker, A. F., et al. (2010) Hypoxia tolerance in animals: biology and application, *Physiol. Biochem. Zool.*, **83**, 733–752, doi: 10.1086/648581.
- Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol. Cell Biol.*, **12**, 5447–5454, doi: 10.1128/MCB.12.12.5447.
- Ratcliffe, P., Koivunen, P., Myllyharju, J., Ragoussis, J., Bovee, J., et al. (2017) Update on hypoxia-inducible factors and hydroxylases in oxygen regulatory pathways: from physiology to therapeutics, *Hypoxia*, **5**, 11–20, doi: 10.2147/HP.S127042.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5510–5514, doi: 10.1073/pnas.92.12.5510.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., and Ohh, M. (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing, *Science*, **292**, 464–468, doi: 10.1126/science.1059817.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., and Gaskell, S. J. (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation, *Science*, **292**, 468–472, doi: 10.1126/science.1059796.
- Semenza, G. L. (2010) Oxygen homeostasis, *Wiley Interdiscip. Rev. Systems Biol. Med.*, **2**, 336–361, doi: 10.1002/wsbm.69.
- Schodel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Mole, D. R. (2011) High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq, *Blood*, **117**, e207–e217, doi: 10.1182/blood-2010-10-314427.
- Hayashi, Y., Zhang, Y., and Yokota, A. (2018) Pathobiological pseudohypoxia as a putative mechanism underlying myelodysplastic syndromes, *Cancer Discov.*, **8**, 1438–1457, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1203.
- Schönenberger, M. J., and Kovacs, W. J. (2015) Hypoxia Signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles, *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 42, doi: 10.3389/fcell.2015.00042.
- Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., et al. (2009) Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 $\alpha$ , *Science*, **324**, 261–265, doi: 10.1126/science.1170944.
- Liu, S., Cadoux-Hudson, T., and Schofield, C. J. (2020) Isocitrate dehydrogenase variants in cancer — cellular consequences and therapeutic opportunities, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **57**, 122–134, doi: 10.1016/j.cbpa.2020.06.012.
- Sonveaux, P., Copetti, T., and De Saedeleer, C. J. (2012) Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis, *PLoS One*, **7**, e33418, doi: 10.1371/journal.pone.0033418.
- Jung, S. Y., Song, H. S., Park, S. Y., Chung, S. H., and Kim, Y. J. (2011) Pyruvate promotes tumor angiogenesis through HIF-1-dependent PAI-1 expression, *Int. J. Oncol.*, **38**, 571–576, doi: 10.3892/ijo.2010.859.
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1999) Interleukin-1 $\beta$ eta

- and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1, *Blood*, **94**, 1561-1567.
18. McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D. E., and Dubois, C. M. (2006) Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression, *J. Biol. Chem.*, **281**, 24171-24181.
  19. Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., et al. (2008) NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ , *Nature*, **453**, 807-811, doi: 10.1038/nature06905.
  20. Liao, D., and Johnson, R. S. (2007) Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 281-290.
  21. Lee, K., Qian, D. Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J. O., and Semenza, G. L. (2009) Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2353-2358.
  22. Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., et al. (2009) Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells, *Cancer Cell*, **15**, 501-513, doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.018.
  23. Wang, Y., Liu, Y., Malek, S. N., Zheng, P., and Liu, Y. (2011) Targeting HIF1 $\alpha$  eliminates cancer stem cells in hematological malignancies, *Cell Stem Cell*, **8**, 399-411, doi: 10.1016/j.stem.2011.02.006.
  24. Korshunov, D. A., Kondakova, I. V., and Shashova, E. E. (2019) Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1129-1142, doi: 10.1134/S000629791910002X.
  25. Vaupel, P., Schmidberger, H., and Mayer, A. (2019) The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression, *Int. J. Radiat. Biol.*, **95**, 912-919, doi: 10.1080/09553002.2019.1589653.
  26. Lau, C. K., Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Yeoh, G. C., et al. (2009) An Akt/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /platelet-derived growth factor-BB autocrine loop mediates hypoxia-induced chemoresistance in liver cancer cells and tumorigenic hepatic progenitor cells, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 3462-3471, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2127.
  27. Esteban, M. A., Tran, M., Harten, S. K., Hill, P., Castellanos, M. C., et al. (2006) Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor, *Cancer Res.*, **66**, 3567-3575.
  28. Kim, K., Lu, Z., and Hay, E. D. (2002) Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT, *Cell Biol. Int.*, **26**, 463-476.
  29. Krishnamachary, B., Zagzag, D., Nagasawa, H., Rainey, K., Okuyama, H., et al. (2006) Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B, *Cancer Res.*, **66**, 2725-2731, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3719.
  30. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 178-196.
  31. Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., and Kelly, B. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1, *Cancer Res.*, **63**, 1138-1143.
  32. Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P. M. (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene, *Cancer Cell*, **3**, 347-361.
  33. Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., et al. (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis, *Nature*, **440**, 1222-1226, doi: 10.1038/nature04695.
  34. Liu, Z. J., Semenza, G. L., and Zhang, H. F. (2015) Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis, *J. Zhejiang Univ. Sci.*, **16**, 32-43.
  35. Zhang, H., Wong, C. C., Wei, H., Gilkes, D. M., Korangath, P., et al. (2011) HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs, *Oncogene*, **31**, 1757-1770, doi: 10.1038/onc.2011.365.
  36. Moeller, B. J., Richardson, R. A., and Dewhirst, M. W. (2007) Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment, *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 241-248, doi: 10.1007/s10555-007-9056-0.
  37. Rohwer, N., and Cramer, T. (2011) Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways, *Drug Resist. Updat.*, **14**, 191-201.
  38. Lyzhko, N. A. (2017) Molecular-genetic mechanisms of initiation, promotion and progression of tumors, *Russ. J. Biother.*, **16**, 7-17, doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-7-17.
  39. Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., et al. (2015) Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research, *Quant. Imaging Med. Surg.*, **5**, 708-729, doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01.
  40. Greten, F. R., and Grivnickov, S. I. (2019) Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences, *Immunity*, **51**, 27-41, doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025.
  41. Stratton, M. R., Campbell, P. J., and Futreal, P. A. (2009) The cancer genome, *Nature*, **458**, 719-724.
  42. Hyndman, I. J. (2016) The contribution of both nature and nurture to carcinogenesis and progression in solid tumours, *Cancer Microenvironment*, **9**, 63-69, doi: 10.1007/s12307-016-0183-4.
  43. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., et al. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *Genes Dev.*, **14**, 34-44.
  44. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., et al. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression, *Genes Dev.*, **14**, 391-396.
  45. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., et al. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res.*, **60**, 1541-1545.
  46. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., and Semenza, G. L. (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3995-4004.
  47. Watts, E. R., and Walmsley, S. R. (2019) Inflammation and hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity, *Trends Mol. Med.*, **25**, 33-46, doi: 10.1016/j.molmed.2018.10.006.
  48. Koshiji, M., To, K. K., Hammer, S., Kumamoto, K., Harris, A. L., and Modrich, P. (2005) HIF-1 $\alpha$  induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS $\alpha$  expression, *Mol. Cell*, **17**, 793-803.
  49. Zeng, M., Kikuchi, H., Pino, M. S., and Chung, D. C. (2010) Hypoxia activates the K-Ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells, *PLoS One*, **5**, e10966, doi: 10.1371/journal.pone.0010966.
  50. Muinao, T., Boruah, H. P. D., and Pal, M. (2018) Diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer

- and the potential roles of cancer stem cells – An updated review, *Exp. Cell. Res.*, **362**, 1-10.
51. Nguyen, P. H., Giraud, J., Chambonnier, L., Dubus, P., Wittkop, L., et al. (2017) Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 1586-1597.
  52. Corro, C., and Moch, H. (2018) Biomarker discovery for renal cancer stem cells, *J. Pathol. Clin. Res.*, **4**, 3-18.
  53. Ayob, A. Z., and Ramasamy, T. S. (2018) Cancer stem cells as key drivers of tumour progression, *J. Biomed. Sci.*, **25**, 20, doi: 10.1186/s12929-018-0426-4.
  54. Oliveira-Costa, J. P., Zanetti, J. S., Silveira, G. G., Soave, D. F., Oliveira, L. R., et al. (2011) Differential expression of HIF-1 $\alpha$  in CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>/low breast ductal carcinomas, *Diagn. Pathol.*, **6**, 73, doi: 10.1186/1746-1596-6-73.
  55. Kondoh, H., Leonart, M. E., Gil, J., Wang, J., Degan, P., et al. (2005) Glycolytic enzymes can modulate cellular life span, *Cancer Res.*, **65**, 177-185.
  56. Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A. J., Heddleston, J. M., et al. (2011) HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells, *Cancer Res.*, **71**, 4640-4652, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320.
  57. Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J. W., and Isaka, K. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT), *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 6076-6083, doi: 10.1128/MCB.24.13.6076-6083.2004.
  58. Mu, R., Zou, Y. K., Tu, K., Wang, D. B., Tang, D., et al. (2021) Hypoxia promotes pancreatic cancer cell dedifferentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential by the HIF-1 $\alpha$ /Notch signaling pathway, *Pancreas*, **50**, 756-765, doi: 10.1097/MPA.0000000000001828.
  59. Gunaratnam, L., Morley, M., Franovic, A., de Paulsen, N., Mekhail, K., et al. (2003) Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor- $\alpha$ /epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL<sup>-/-</sup> renal cell carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 44966-44974, doi: 10.1074/jbc.M305502200.
  60. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., et al. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4604-4613.
  61. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G., Semenza, G. L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2, *Cancer Res.*, **59**, 3915-3918.
  62. Dallas, N. A., Fan, F., Gray, M. J., Van Buren, G., Lim, S. J., et al. (2007) Functional significance of vascular endothelial growth factor receptors on gastrointestinal cancer cells, *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 433-441, doi: 10.1007/s10555-007-9070-2.
  63. Grimshaw, M. J. (2007) Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer, *Endocr. Relat. Cancer*, **14**, 233-244.
  64. Larráyoz, I. M., Martínez-Herrero, S., García-Sanmartín, J., Ochoa-Callejero, L., and Martínez, A. (2014) Adrenomedullin and tumour microenvironment, *J. Transl. Med.*, **12**, 339, doi: 10.1186/s12967-014-0339-2.
  65. Szenajch, J., Weislo, G., Jeong, J. Y., Szczylik, C., and Feldman, L. (2010) The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells. From clinic to bench – a critical review, *Biochim. Biophys. Acta*, **1806**, 82-95, doi: 10.1016/j.bbcan.2010.04.002.
  66. Keith, B., and Simon, M. C. (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer, *Cell*, **129**, 465-472.
  67. Warburg, O. (1925) The metabolism of carcinoma cells, *J. Cancer Res.*, **9**, 148-163, doi: 10.1158/jcr.1925.148.
  68. Dang, C. V., and Semenza, G. L. (1999) Oncogenic alterations of metabolism, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 68-72.
  69. Kobliakov, V. A. (2019) The mechanisms of regulation of aerobic glycolysis (Warburg effect) by oncoproteins in carcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1117-1128, doi: 10.1134/S0006297919100018.
  70. Shanmugam, M., McBrayer, S. K., and Rosen, S. T. (2009) Targeting the Warburg effect in hematological malignancies: from PET to therapy, *Curr. Opin. Oncol.*, **21**, 531-536, doi: 10.1097/CCO.0b013e328323f57ec.
  71. Semenza, G. L. (2009) Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1, *Semin. Cancer Biol.*, **19**, 12-16, doi: 10.1016/j.semcancer.2008.11.009.
  72. Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. L., Walenta, S., Clough, R. W., and Dewhirst, M. W. (2001) Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **51**, 349-353.
  73. Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., and Melino, G. (2018) The hypoxic tumour microenvironment, *Oncogenesis*, **7**, 10, doi: 10.1038/s41389-017-0011-9.
  74. Ammirante, M., Shalapour, S., Kang, Y., Jamieson, C. A., and Karin, M. (2014) Tissue injury and hypoxia promote malignant progression of prostate cancer by inducing CXCL13 expression in tumor myofibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14776-14781.
  75. Gilkes, D. M., Semenza, G. L., and Wirtz, D. (2014) Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis, *Nat. Rev. Cancer*, **14**, 430-439.
  76. Semenza, G. L. (2008) Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate, *J. Clin. Invest.*, **118**, 3835-3837.
  77. Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H. H., et al. (2013) Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion, *Cancer Res.*, **73**, 1524-1535, doi: 10.1158/0008.5472.CAN\_12.2796.
  78. Brown, J. M., and Wilson, W. R. (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 437-447.
  79. Nordsmark, M., Hoyer, M., Keller, J., Nielsen, O. S., Jensen, O. M., and Overgaard, J. (1996) The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **35**, 701-708, doi: 10.1016/0360-3016(96)00132-0.
  80. Nordsmark, M., Overgaard, M., and Overgaard, J. (1996) Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, *Radiother. Oncol.*, **41**, 31-39, doi: 10.1016/S0167-8140(96)91811-3.
  81. Höckel, M., and Vaupel, P. (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects, *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 266-276, doi: 10.1093/jnci/93.4.266.
  82. Höckel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schaffer, U., and Vaupel, P. (1996) Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix, *Cancer Res.*, **56**, 4509-4515.
  83. Vaupel, P., Höckel, M., and Mayer, A. (2007) Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography, *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 1221-1235, doi: 10.1089/ars.2007.1628.
  84. Le, Q. T., Chen, E., Salim, A., Cao, H., Kong, C. S., and Whyte, R. (2006) An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 1507-1514, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2049.
  85. Koong, A. C., Mehta, V. K., Le, Q. T., Fisher, G. A., Terris, D. J., and Brown, J. M. (2000) Pancreatic tumors show high levels of hypoxia, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **48**, 919-922.
  86. Parker, C., Milosevic, M., Toi, A., Sweet, J., Panzarella, T., and Bristow, R. (2004) Polarographic electrode study of

- tumor oxygenation in clinically localized prostate cancer, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **58**, 750-757, doi: 10.1016/S0360-3016(03)01621-3.
87. Lartigau, E., Randrianarivelo, H., Avril, M. F., Margulis, A., Spatz, A., et al. (1997) Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma, *Melanoma Res.*, **7**, 400-406.
  88. Xiu, Lv, Li, J., Zhang, C., Hu, T., Li, S., et al. (2017) The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism, *Genes Diseases*, **4**, 19-24, doi: 10.1016/j.gendis.2016.11.003.
  89. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011) Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 417-427, doi: 10.1038/nrd3455.
  90. Lee, K., Zhang, H., Qian, D. Z., Rey, S., Liu, J. O., and Semenza, G. L. (2009) Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17910-17915, doi: 10.1073/pnas.0909353106.
  91. Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., et al. (2004) Loss of HIF-1 $\alpha$  in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis, *Cancer Cell*, **6**, 485-495.
  92. Skuli, N., Majmundar, A. J., Krock, B. L., Mesquita, R. C., Mathew, L. K., et al. (2012) Endothelial HIF-2 $\alpha$  regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes, *J. Clin. Invest.*, **122**, 1427-1443.
  93. Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E. J., and Krek, W. (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL, *Nature*, **425**, 307-311.
  94. Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Kaigorodova, E. V., et al. (2019) Intravasation as a key step in cancer metastasis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 762-772, doi: 10.1134/S0320972519070078.
  95. Burtscher, M., Mairer, K., Wille, M., Gatterer, H., Ruedl, G., et al. (2012) Short-Term exposure to hypoxia for work and leisure activities in health and disease: which level of hypoxia is safe? *Sleep Breathing*, **16**, 435-442, doi: 10.1007/s11325-011-0521-1.
  96. Zarubina, I. V. (2011) Modern view on pathogenesis of hypoxia and its pharmacological correction, *Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther.*, **9**, 31-48.
  97. Kirova, Y. I., Germanova, E. L., and Lukyanova, L. D. (2013) Phenotypic features of the dynamics of HIF-1 $\alpha$  levels in rat neocortex in different hypoxia regimens, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **154**, 718-722, doi: 10.1007/s10517-013-2038-z.
  98. Colgan, S. P., Furuta, G. T., and Taylor, C. T. (2020) Hypoxia and innate immunity: keeping up with the HIFsters, *Annu. Rev. Immunol.*, **26**, 341-363, doi: 10.1146/annurev-immunol-100819-121537.
  99. Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., et al. (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases, *Cancer Res.*, **59**, 5830-5835.
  100. Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., et al. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages, *Am. J. Pathol.*, **157**, 411-421.
  101. Flamme, I., Krieg, M., and Plate, K. H. (1998) Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2 $\alpha$ , *Am. J. Pathol.*, **153**, 25-29, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65541-1.
  102. Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., and Plate, K. H. (2000) Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function, *Oncogene*, **19**, 5435-5443, doi: 10.1038/sj.onc.1203938.
  103. Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., and Sivridis, E. (2001) Relation of hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  and 2  $\alpha$  in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival, *Br. J. Cancer*, **85**, 881-890, doi: 10.1054/bjoc.2001.2018.
  104. Wong, C. C., Zhang, H., Gilkes, D. M., Chen, J., Wei, H., et al. (2012) Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis, *J. Mol. Med. (Berl)*, **90**, 803-815.
  105. Chen, W., He, D., Li, Z., Zhang, X., Pan, D., and Chen, G. (2015) Overexpression of vascular endothelial growth factor indicates poor outcomes of glioma: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **15**, 8709-8719.
  106. Kaur, B., Khwaja, F. W., Severson, E. A., Matheny, S. L., Brat, D. J., and Van Meir, E. G. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis, *Neuro Oncol.*, **7**, 134-153, doi: 10.1215/S1152851704001115.
  107. Shen, C., Beroukhi, R., Schumacher, S. E., Zhou, J., Chang, M., and Signoretti, S. (2011) Genetic and functional studies implicate HIF1 $\alpha$  as a 14q kidney cancer suppressor gene, *Cancer Discov.*, **1**, 222-235.
  108. Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breiteneker, G., and Oberhuber, G. (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1661-1668.
  109. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Skarlatos, J., Corti, L., Blandamura, S., et al. (2001) Hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ ) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy, *Cancer Res.*, **61**, 1830-1832.
  110. Mazumdar, J., Hickey, M. M., Pant, D. K., Durham, A. C., Sweet-Cordero, A., et al. (2010) HIF-2 $\alpha$  deletion promotes Kras-driven lung tumor development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14182-14187.
  111. Triner, D., and Shah, Y. M. (2016) Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer, *J. Clin. Invest.*, **126**, 3689-3698, doi: 10.1172/JCI84430.
  112. Wenwu, L., Xuejun, S., Hengyi, T., and Kan, L. (2013) Hyperbaric oxygen and cancer: more complex than we expected, *Target. Oncol.*, **8**, 79-81.
  113. Mallory, M., Gogineni, E., and Jones, G. C. (2015) Therapeutic hyperthermia: the old, the new, and the upcoming, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **97**, 56-64, doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.003.
  114. Fallah, J., and Rini, B. I. (2019) HIF inhibitors: status of current clinical development, *Curr. Oncol. Rep.*, **21**, 6, doi: 10.1007/s11912-019-0752-z.
  115. Greenberger, L. M., Horak, I. D., Filpula, D., Sapra, P., Westergaard, M., et al. (2008) A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ , EZN-2968, inhibits tumor cell growth, *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 3598-3608.
  116. Lee, K., and Kim, H. M. (2011) A novel approach to cancer therapy using PX-478 as a HIF-1 $\alpha$  inhibitor, *Arch. Pharm. Res.*, **34**, 1583-1585.
  117. Terzuoli, E., Puppo, M., Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Cao, L., et al. (2010) Aminoflavone, a ligand of the aryl hydrocarbon receptor, inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in an AhR-independent fashion, *Cancer Res.*, **70**, 6837-6848.
  118. Coltella, N., Valsecchi, R., Ponente, M., Ponzoni, M., and Bernardi, R. (2015) Synergistic leukemia eradication by combined treatment with retinoic acid and HIF inhibition

- by EZN-2208 (PEG-SN38) in preclinical models of PML-RAR $\alpha$  and PLZF-RAR $\alpha$ -driven leukemia, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 3685-3694.
119. Rapisarda, A., Zalek, J., Hollingshead, M., Braunschweig, T., Uranchimeg, B., et al. (2004) Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts, *Cancer Res.*, **64**, 6845-6848.
  120. Zhang, H., Qian, D. Z., Tan, Y. S., Lee, K., Gao, P., et al. (2008) Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 $\alpha$  synthesis and block tumor growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19579-19586.
  121. Ning, X., Wang, Y., Yan, W., Li, G., and Sang, N. (2018) Chitin synthesis inhibitors promote liver cancer cell metastasis via interfering with hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *Chemosphere*, **206**, 231-237, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.014.
  122. Majeesh, N. J., Escuin, D., LaVallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., et al. (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF, *Cancer Cell*, **3**, 363-375.
  123. Alqawi, O., Moghaddas, M., and Singh, G. (2006) Effects of geldanamycin on HIF-1 $\alpha$  mediated angiogenesis and invasion in prostate cancer cells, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **9**, 126-135, doi: 10.1038/sj.pcan.4500852.
  124. Xiang, L., Gilkes, D. M., Chaturvedi, P., Luo, W., Hu, H., et al. (2014) Ganetespib blocks HIF-1 activity and inhibits tumor growth, vascularization, stem cell maintenance, invasion, and metastasis in orthotopic mouse models of triple-negative breast cancer, *J. Mol. Med.*, **92**, 151-164.
  125. Bailey, C. M., Liu, Y., Peng, G., Zhang, H., He, M., et al. (2020) Liposomal formulation of HIF-1 $\alpha$  inhibitor echinomycin eliminates established metastases of triple-negative breast cancer, *Nanomedicine*, **29**, 102278, doi: 10.1016/j.nano.2020.102278.
  126. Новиков В. Е., Левченкова О. С. (2013) Гипоксией индуцированный фактор (HIF-1 $\alpha$ ) как мишень фармакологического воздействия, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **11**, 8-16.
  127. Sen Banerjee, S., Thirunavukkarasu, M., Tipu Rishi, M., et al. (2012) HIF-prolyl hydroxylases and cardiovascular diseases, *Toxicol. Mech. Methods*, **22**, 347-358.
  128. Souza, E., Cho, K. H., Harris, S. T., Flindt, N. R., Watt, R. K., and Pai, A. B. (2020) Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors: a paradigm shift for treatment of anemia in chronic kidney disease? *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **29**, 831-844, doi: 10.1080/13543784.2020.1777276.
  129. Cummins, E. P., Seeballuck, F., Keely, S. J., Mangan, N. E., Callanan, J. J., et al. (2008) The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis, *Gastroenterology*, **134**, 156-165.
  130. Каркищенко Н. Н. (2017) Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации, ФМБА России, Москва, с. 98.
  131. Fu, Z., Mowday, A. M., Smaill, J. B., Hermans, I. F., and Patterson, A. V. (2021) Tumour hypoxia-mediated immunosuppression: mechanisms and therapeutic approaches to improve cancer immunotherapy, *Cells*, **10**, 1006, doi: 10.3390/cells10051006.
  132. Fracasso, P. M., and Sartorelli, A. C. (1986) Cytotoxicity and DNA lesions produced by mitomycin C and porfiromycin in hypoxic and aerobic EMT6 and Chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, **46**, 3939-3944, doi: 10.1016/0304-3835(86)90123-0.
  133. Baran, N., and Konopleva, M. (2017) Molecular pathways: hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 2382-2390.
  134. Spiegelberg, L., Houben, R., Niemans, R., de Ruyscher, D., Yaromina, A., et al. (2019) Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress: the need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials, *Clin. Transl. Radiat. Oncol.*, **18**, 62-69, doi: 10.1016/j.ctro.2019.01.005.
  135. Li, Y., Zhao, L., and Li, X.-F. (2021) The hypoxia-activated prodrug TH-302: exploiting hypoxia in cancer therapy, *Front. Pharmacol.*, **12**, 636892, doi: 10.3389/fphar.2021.636892.
  136. Milosevic, M., Fyles, A., Hedley, D., and Hill, R. (2004) The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure, *Semin. Radiat. Oncol.*, **14**, 249-258.
  137. O'Connor, J. P., Boulton, J. K., Jamin, Y., Babur, M., Finegan, K. G., et al. (2016) Oxygen-enhanced MRI accurately identifies, quantifies, and maps tumor hypoxia in preclinical cancer models, *Cancer Res.*, **76**, 787-795.
  138. Samanta, D., Gilkes, D. M., Chaturvedi, P., Xiang, L., and Semenza, G. L. (2014) Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E5429-5438.
  139. Flamant, L., Notte, A., Ninane, N., Raes, M., and Michiels, C. (2010) Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia, *Mol. Cancer*, **9**, 191.
  140. Graham, K., and Unger, E. (2018) Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment, *Int. J. Nanomed.*, **13**, 6049.
  141. Fu, Z., Chen, D., Cheng, H., and Wang, F. (2015) Hypoxia-inducible factor-1 protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under hypoxia, *Med. Sci. Monit.*, **21**, 318-325.
  142. Peng, C., Liu, G., Huang, K., Zheng, Q., Li, Y., and Yu, C. (2018) Hypoxia-induced upregulation of HE4 is responsible for resistance to radiation therapy of gastric cancer, *Mol. Ther. Oncolytics*, **12**, 49-55.
  143. Hassouna, I., Sperling, S., Kim, E., Schulz-Schaeffer, W., Rave-Fränk, M., et al. (2008) Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **72**, 927-934.
  144. Milne, A. N., Carneiro, F., O'Morain, C., and Offerhaus, G. J. A. (2009) Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer, *Hum. Genet.*, **126**, 615-628.
  145. Perera, F. P. (1997) Environment and cancer: who are susceptible? *Science*, **278**, 1068-1073.
  146. Brooks, J. T., Elvidge, G. P., Glenney, L., Gleadle, J. M., Liu, C., et al. (2008) Variations within oxygen-regulated gene expression in humans, *J. Appl. Physiol.*, **106**, 212-220, doi: 10.1152/jappphysiol.90578.2008.
  147. Van Patot, M. C., and Gassmann, M. (2011) Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2 $\alpha$ , *High Alt. Med. Biol.*, **12**, 157-167, doi: 10.1089/ham.2010.1099.
  148. Li, D., Liu, J., Zhang, W., Ren, J., Yan, L., and Liu, H. (2013) Association between HIF1A P582S and A588T polymorphisms and the risk of urinary cancers: a meta-analysis, *PLoS One*, **8**, e63445.
  149. Li, H., N., He, T., Yong, J. Z., Fang, D., Liu, J., et al. (2019) HIF-1 $\alpha$  Rs11549465 C>T Polymorphism contributes to increased cancer susceptibility: evidence from 49 studies, *J. Cancer*, **10**, 5955-5963, doi: 10.7150/jca.35716.
  150. Jain, K., Suryakumar, G., Prasad, R., and Ganju, L. (2013) Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia, *High Alt. Med. Biol.*, **14**, 65-77, doi: 10.1089/ham.2012.1064.
  151. Dzhaliilova, D. S., Kosyeva, A. M., Diatroptov, M. E., Ponomarenko, E. A., Tsvetkov, I. S., et al. (2019)

- Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats, *J. Inflamm. Res.*, **12**, 73–86, doi: 10.2147/JIR.S194581.
152. Belosludtsev, K. N., Dubinin, M. V., Talanov, E. Y., Starinets, V. S., Tenkov, K. S., et al. (2020) Transport of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent permeability transition in the liver and heart mitochondria of rats with different tolerance to acute hypoxia, *Biomolecules*, **10**, 114, doi: 10.3390/biom10010114.
  153. Dzhaliilova, D., and Makarova, O. (2020) Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics, *Biomedicines*, **8**, 428, doi: 10.3390/biomedicines8100428.
  154. Glazachev, O. S., Geppe, N. A., Timofeev, Yu. S., Samartseva, V. G., Dudnik, E. N., et al. (2020) Indicators of individual hypoxia resistance – a way to optimize hypoxic training for children, *Ros. Vestn. Perinatol. Pediatr.*, **65**, 78–84, doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-4-78-84.
  155. Lu, H., Wang, R., Li, W., Xie, H., Wang, C., et al. (2016) Plasma cytokine profiling to predict susceptibility to acute mountain sickness, *Eur. Cytokine Netw.*, **27**, 90–96, doi: 10.1684/ecn.2016.0383.
  156. Soree, P., Gupta, R. K., Singh, K., Desiraju, K., Agrawal, A., et al. (2016) Raised HIF1 $\alpha$  during normoxia in high altitude pulmonary edema susceptible non-mountaineers, *Sci. Rep.*, **6**, 26468, doi: 10.1038/srep26468.
  157. Sinha, S., Ray, U. S., Tomar, O. S., and Singh, S. N. (2009) Different adaptation patterns of antioxidant system in natives and so-journers at high altitude, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **167**, 255–260.
  158. Dzhaliilova, D. S., Diatropov, M. E., Tsvetkov, I. S., Makarova, O. V., and Kuznetsov, S. L. (2018) Expression of Hif-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and VEGF genes in the liver and blood serum levels of HIF-1 $\alpha$ , erythropoietin, VEGF, TGF- $\beta$ , 8-isoprostane, and corticosterone in Wistar rats with high and low resistance to hypoxia, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165**, 781–785, doi: 10.1007/s10517-018-4264-x.
  159. Hsieh, C. H., Lee, C. H., Liang, J. A., Yu, C. Y., and Shyu, W. C. (2010) Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity, *Oncol. Rep.*, **24**, 1629–1636.
  160. Джалилова Д. Ш., Полякова М. А., Диатропов М. Е., Золотова Н. А., Макарова О. В. (2018) Морфологические изменения толстой кишки и состав лимфоцитов периферической крови при остром колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии, *Молекулярная медицина*, **6**, 46–50, doi: 10.29296/24999490-2018-06-08.
  161. Джалилова Д. Ш., Золотова Н. А., Полякова М. А., Диатропов М. Е., Добрынина М. Т., Макарова О. В. (2018) Морфологические особенности воспалительного процесса и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при хроническом колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии, *Клиническая и экспериментальная морфология*, **4**, 13–19, doi: 10.31088/2226-5988-2018-28-4-13-20.
  162. Fridman, I. A., Ponomarenko, E. A., Makarova, O. V., Postovalova, E. A., Zolotova, N. A., et al. (2020) Morphological characteristic of melanoma B16 progression in C57BL/6 mice with high and low resistance to hypoxia, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **168**, 390–394, doi: 10.1007/s10517-020-04716-w.
  163. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Kouskourakis, C., Gatter, K. C., Harris, A. L., and Koukourakis, M. I. (2003) Hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin, *Melanoma Res.*, **13**, 493–501, doi: 10.1097/00008390-200310000-00008.
  164. Valencak, J., Kittler, H., Schmid, K., Schreiber, M., Raderer, M., and Gonzalez-Inchaurrea, M. (2009) Prognostic relevance of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  expression in patients with melanoma, *Clin. Exp. Dermatol.*, **34**, e962–e964, doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03706.x.
  165. Park, T. J., Reznick, J., Peterson, B. L., Blass, G., Omerbašić, D., et al. (2017) Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat, *Science*, **21**, 307–311, doi: 10.1126/science.aab3896.
  166. Delaney, M. A., Ward, J. M., Walsh, T. F., Chinnadurai, S. K., Kerns, K., et al. (2016) Initial case reports of cancer in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*), *Vet. Pathol.*, **53**, 691–696.
  167. Xiao, B., Wang, S., Yang, G., Sun, X., Zhao, S., et al. (2017) HIF-1 $\alpha$  contributes to hypoxia adaptation of the naked mole rat, *Oncotarget*, **8**, 109941–109951, doi: 10.18632/oncotarget.22767.
  168. Augustin, L. S., Kendall, C. W., Jenkins, D. J., Willett, W. C., Astrup, A., et al. (2015) Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC), *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **25**, 795–815.
  169. Duan, W., Shen, X., Lei, J., Xu, Q., Yu, Y., et al. (2014) Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 461917.
  170. Chen, J. (2011) Multiple signal pathways in obesity-associated cancer, *Obes. Rev.*, **12**, 1063–1070.
  171. Ranhotra, H. S., and Sharma, R. (2010) Moderately high altitude habitation modulates lipid profile and alkaline phosphatase activity in aged Khasis of Meghalaya, *IJCB*, **25**, 51–56.
  172. Weinberg, C. R., Brown, K. G., and Hoel, D. G. (1987) Altitude, radiation, and mortality from cancer and heart disease, *Radiat. Res.*, **112**, 381–390.
  173. Hart, J. (2013) Land elevation and cancer mortality in US. Cities and counties using median elevations derived from geographic information systems, *Dose Response*, **11**, 41–48.
  174. Simeonov, K. P., and Himmelstein, D. S. (2015) Lung cancer incidence decreases with elevation: evidence for oxygen as an inhaled carcinogen, *PeerJ*, **3**, e705, doi: 10.7717/peerj.705.
  175. Amsel, J., Waterbor, J. W., Oler, J., Rosenwaike, I., and Marshall, K. (1982) Relationship of site-specific cancer mortality rates to altitude, *Carcinogenesis*, **3**, 461–465.
  176. Aceituno-Madera, P., Buendia-Eisman, A., Olmo, F. J., Jimenez-Moleon, J. J., and Serrano-Ortega, S. (2011) Melanoma, altitude, and UV-B radiation, *Actas Dermosifiliogr.*, **102**, 199–205.
  177. Astrom, K., Cohen, J. E., Willett-Brozick, J. E., Aston, C. E., and Baysal, B. E. (2003) Altitude is a phenotypic modifier in hereditary paraganglioma type 1: evidence for an oxygen-sensing defect, *Hum. Genet.*, **113**, 228–237.
  178. Torres, J., Correa, P., Ferreccio, C., Hernandez-Suarez, G., and Herrero, R. (2013) Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America, *Cancer Causes Control*, **24**, 249–256.
  179. Garrido, D. I., and Garrido, S. M. (2018) Cancer risk associated with living at high altitude in Ecuadorian population from 2005 to 2014, *Clujul Med.*, **91**, 188–196.
  180. Kabuto, M., Imai, H., Yonezawa, C., Neriishi, K., Akiba, S., et al. (1994) Prediagnostic serum selenium and zinc levels and subsequent risk of lung and stomach cancer in Japan, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **3**, 465–469.
  181. Bikle, D. D. (2016) Extracellular actions of vitamin D, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1376**, 29–52, doi: 10.1111/nyas.13219.
  182. Merrill, R. M., and Frutos, A. M. (2020) Ecological evidence for lower risk of lymphoma with greater exposure to sunlight and higher altitude, *High Alt. Med. Biol.*, **21**, 37–44, doi: 10.1089/ham.2019.0054.

## HIF-DEPENDENT MECHANISMS OF RELATIONSHIP OF HYPOXIA TOLERANCE AND TUMOR DEVELOPMENT

### Review

**D. Sh. Dzhaliлова\* and O. V. Makarova**

*Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Human Morphology",  
117418 Moscow, Russia; E-mail: juliajal93@mail.ru*

Oxygen deficiency is one of the key pathogenetic factors determining development and severity of many diseases, including inflammatory, infectious diseases, and cancer. Lack of oxygen activates the signaling pathway of the hypoxia-inducible transcription factor HIF in cells that has three isoforms, HIF-1, HIF-2, HIF-3, regulating expression of several thousand genes. Throughout tumor progression, HIF activation stimulates angiogenesis, promotes changes in cell metabolism, adhesion, invasiveness, and ability to metastasize. HIF isoforms can play opposite roles in the development of inflammatory and neoplastic processes. Humans and laboratory animals differ both in tolerance to hypoxia and in the levels of expression of HIF and HIF-dependent genes, which may lead to predisposition to the development of certain oncological disorders. In particular, the ratio of different histogenetic types of tumors may vary among people living in the mountains and at the sea level. However, despite the key role of hypoxia at almost all stages of tumor development, basal tolerance to oxygen deficiency is not considered as a factor of predisposition to the tumor growth initiation. In literature, there are many works characterizing the level of local hypoxia in various tumors, and suggesting fundamental approaches to its mitigation by HIF inhibition. HIF inhibitors, as a rule, have a systemic effect on the organism, however, basal tolerance of an organism to hypoxia as well as the level of HIF expression are not taken into account in the process of their use. The review summarizes the literature data on different HIF isoforms and their role in tumor progression, with extrapolation to organisms with high and low tolerance to hypoxia, as well as on the prevalence of various types of tumors in the populations living at high altitudes.

**Keywords:** hypoxia tolerance, high altitude, tumor progression, HIF, angiogenesis

УДК 577.21

## ВЛИЯНИЕ ОМЕПРАЗОЛА НА ОСТЕОБЛАСТЫ И ОСТЕОКЛАСТЫ *in vivo* И В МОДЕЛИ *in vitro* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЧЕШУИ РЫБЫ

© 2021 M.I. Zanaty<sup>1</sup>, A. Abdel-Moneim<sup>2\*</sup>, Y. Kitani<sup>3</sup>, T. Sekiguchi<sup>3</sup>, N. Suzuki<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology and Life Sciences Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt

<sup>2</sup> Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel\_men2020@yahoo.com

<sup>3</sup> Noto Marine Laboratory, Division of Marine Environmental Studies, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Noto-Cho, 927-0553 Ishikawa, Japan

Поступила в редакцию 10.02.2021

После доработки 27.05.2021

Принята к публикации 06.08.2021

Омепразол подавляет чрезмерную секрецию кислоты желудочного сока за счет необратимого ингибирования  $H^+/K^+$ -АТРазы в париетальных клетках желудка. Проведенный недавно метаанализ данных выявил связь между применением ингибиторов протонной помпы и повышенным риском переломов костей, однако молекулярный механизм, лежащий в основе такого действия ингибиторов, остается неизвестен. В настоящем исследовании мы продемонстрировали прямое влияние омепразола на метаболизм костей, используя уникальную *in vitro* модель с применением чешуи костистой рыбы, а также путем *in vivo* исследований на рыбках *Carassius auratus*. Исследование *in vitro* показало, что 6-часовая инкубация с омепразолом приводит к значительному усилению активности щелочной фосфатазы и тартрат-резистентной кислой фосфатазы. Экспрессия мРНК нескольких маркеров остеокластов повышалась после 3-часовой инкубации рыбьей чешуи с омепразолом в концентрации  $10^{-7}$  М. В экспериментах *in vivo* было продемонстрировано значительное повышение уровня кальция в плазме *Carassius auratus* под действием омепразола. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* позволяют предположить, что омепразол влияет на костные клетки, усиливая резорбцию костной ткани путем регуляции экспрессии генов остеокластов, а также способствуя высвобождению кальция в кровоток. Предлагаемый анализ *in vitro* с использованием рыбьей чешуи представляет собой практическую модель, которая может быть применена для исследования воздействия лекарственных препаратов на метаболизм костей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** омепразол, чешуя рыбы, гены транскрипционных факторов, гены остеокластов.

DOI: 10.31857/S032097252110002X

### ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы протонной помпы (ИПП) — это группа препаратов, обычно используемых для лечения кислотозависимых заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как пептические язвы и гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ), а также для предотвращения рецидивов язвы, связанных с приемом аспири-

на/нестероидных противовоспалительных препаратов [1]. Омепразол был первым ИПП, появившимся на рынке фармакологических препаратов этой группы. Он приводит к уменьшению секреции кислоты желудочного сока путем избирательного ингибирования  $H^+/K^+$ -АТРазы в париетальных клетках желудка и снижения переноса  $H^+$  в полость желудка [2].

Эпидемиологические исследования показали наличие связи между длительным применением ИПП и метаболизмом костей [3]. Было обнаружено, что ИПП могут приводить к повышению риска переломов костей, особенно бедер, запястий и позвоночника [4]. Ежегодно во всем мире регистрируется ~1,6 млн случаев перелома шейки бедра, и полагают, что к 2050 г. это число достигнет 5–6 млн [5]. Основываясь на многочисленных опубликованных данных, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США вынесло распоряжение о необходимости размеще-

Принятые сокращения: ИПП — ингибитор протонной помпы; AP — щелочная фосфатаза; CTR — рецептор кальцитонина; CTSK — катепсин K; DC-STAMP — трансмембранный белок, специфичный для дендритных клеток; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; MMP-9 — матриксная металлопептидаза 9; NFATc1 — ядерный фактор активированных T-клеток цитоплазматический 1; OPG — остеопротегерин; RANKL — лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B; TNF — фактор некроза опухоли; TNFR — рецептор фактора некроза опухоли; TRAP — тартрат-резистентная кислая фосфатаза; TRAF6 — фактор 6, ассоциированный с рецептором TNF.

\* Адресат для корреспонденции.

ния предупреждения о повышенном риске переломов костей в инструкции по применению ИПП [6].

Ремоделирование кости — это сложный процесс, при котором старая кость заменяется новой посредством скоординированных действий четырех различных типов костных клеток: остеобластов, остеокластов, остеоцитов и мезенхимальных клеток кости, совместно формирующих анатомическую структуру, называемую базисной многоклеточной единицей [7, 8]. Связь между различными типами костных клеток и матриксом имеет особое значение, поскольку последний не только формирует подушку для костных клеток, но также играет важную роль в регулировании активности клеток посредством молекул адгезии [9]. У млекопитающих было показано наличие взаимодействия между остеобластами и остеокластами — следовательно, при исследовании метаболизма костной ткани следует учитывать связь между различными типами клеток кости [10].

Одной из удобных моделей для изучения костной ткани является чешуя костистых рыб (например, золотой рыбки *Carassius auratus*). Их чешуйки представляют собой кальцинированную ткань, состоящую из остеобластов, остеокластов и костного матрикса [11]. Кроме того, структура остеокластов и остеобластов чешуек аналогична таковой у млекопитающих [12].

Связь между приемом ИПП и повышенным риском переломов костей была выявлена ранее, хотя лежащие в ее основе молекулярные механизмы до сих пор остаются не ясными [13]. В настоящей статье мы исследовали влияние омепразола на метаболизм костей *in vivo* и *in vitro* с использованием чешуи костистых рыб, представляющей собой уникальную модельную систему.

В первую очередь на модели *in vitro* мы продемонстрировали положительное влияние омепразола на костные клетки посредством изменения активности ферментов. Затем мы определили временное окно для действия этого препарата на метаболизм костей *in vivo*. И наконец, с помощью *in vitro* модели мы изучили влияние омепразола на экспрессию генов интереса в определенные промежутки времени.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Шестьдесят взрослых золотых рыбок (*C. auratus*) были приобретены у коммерческого продавца (рыбная ферма «Хигасикава», Япония) и помещены в аквариум, где поддерживалась температура

$25 \pm 0,5$  °C. Каждое утро рыбок кормили рекомендуемым количеством стандартного гранулированного корма, состоящего из 42,0% белков, 11,0% жиров, 2,0% клетчатки и 10,5% смеси минералов и витаминов («Feed One Co., Ltd.», Япония). Перед исследованиями *in vivo* и *in vitro* золотым рыбкам давали достичь средней массы тела 25,0–35,0 г.

**Влияние омепразола на маркеры остеокластов и остеобластов *in vitro*.** Золотых рыбок анестезировали этил-3-аминобензоатом («Sigma-Aldrich», США) и удаляли по 24 естественно развитых чешуйки с каждой стороны тела. Чешую инкубировали в течение 6 ч в среде Лейбовица L-15 («Invitrogen», США), содержащей 1%-ную смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) («ICN Biomedicals», США), с добавлением различных концентраций омепразола («Cayman Chemical», Япония; номер в каталоге 14880, чистота >98%) или DMSO (контроль).

Действие омепразола на остеокласты и остеобласты оценивали путем измерения активности соответствующих маркеров [тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP) и щелочной фосфатазы (AP)]. Для каждого ферментативного анализа чешую собирали у 10 рыб. Двадцать четыре чешуйки с одной стороны тела инкубировали при 15 °C в течение 6 ч с  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  М омепразола ( $n = 8$  для каждой концентрации). Чешую с другой стороны тела инкубировали при тех же условиях в среде, содержащей соответствующие концентрации DMSO, и использовали в качестве контроля. Активность TRAP и AP определяли ранее описанным методом [14]. Размер чешуек рыб высчитывали с помощью программы ImageJ (NIH, США), и определяемые активности TRAP и AP нормализовали к соответствующей площади поверхности ( $\text{мм}^2$ ) каждой чешуйки.

**Влияние омепразола на уровень кальция в плазме крови *C. auratus in vivo*.** Золотых рыбок анестезировали как описано выше, вводили внутривенно  $10^{-7}$  М омепразола (34,5 нг/г массы тела) или  $10^{-7}$  М DMSO (контроль) ( $n = 10$  в каждой группе животных), а затем оставляли в аквариуме на один день. Длительность эксперимента была определена и скорректирована с учетом гормональных изменений в организме рыбок и токсических эффектов, влияющих на животных на протяжении двух дней [11]. Чтобы исключить потребление и усвоение кишечника кальция, полученного из корма, золотых рыбок не кормили непосредственно в ходе эксперимента.

Гепаринизированным шприцем брали образцы крови из хвостовой вены анестезированных экспериментальных и контрольных золо-

Праймеры, используемые в количественной ПЦР

| Ген             | Прямой праймер          | Обратный праймер         | Рег. номер |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|------------|
| <i>RANKL</i>    | CGAGTGTGGCGATTTTGTG     | ATGGGCGTCTTGATTGGAAG     | AB894120   |
| <i>OPG</i>      | CGTGAACACGGTGTGCGAGTGT  | CCTCTGCGCAGGCCTCACA      | AB970727   |
| <i>TRAF6</i>    | TCTGATGGGTCTTCGCTCGGCT  | ACTGGACATTTCTGCCCCGTGT   | LC149878   |
| <i>NFATc1</i>   | CTGTGGCTTTGCTTGTGGATGTC | GATGCTGGTGTTTTGGCTGTAACC | AB685221   |
| <i>CTR</i>      | AAAGCAGAGCCCACCACTGA    | CTGCTGCAGAACGAACCTGT     | LC368623   |
| <i>CTSK</i>     | TGGGAGGGCTGGAACCTCAC    | CATGAGCCGCATGAACCTTG     | AB236969   |
| <i>MMP-9</i>    | GCTTCTGCCCCAGTGAGCTT    | GTGGAGCACCAGCGATACCC     | AB889498   |
| <i>DC-STAMP</i> | TTCGCTGTTTTGGAGCCTTG    | TGCTTTCCACCCATTTTAGC     | AB894123   |
| <i>GAPDH</i>    | CGCCGATGTGTCTGTTGTTG    | CTTGACGGCCTCCTTGATGT     | FX986058   |

тых рыбок через 3, 6, 12 и 24 ч после инъекции. Собранные образцы крови переносили в пластиковые пробирки и центрифугировали при 15 000 об./мин в течение 4 мин. Затем отбирали плазму, сразу же ее замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили до использования. Общую концентрацию кальция в плазме (рассчитанную в мг/100 мл) измеряли с помощью набора «Calcium E kit» («Wako Pure Chemical Industries», Япония) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Экспрессия мРНК маркеров остеобластов и остеокластов *in vitro*.** Для исследования изменения экспрессии генов в костных клетках при действии омепразола ( $10^{-7}$  М) у анестезированных золотых рыбок собирали чешую и инкубировали в течение 3 и 6 ч в среде Лейбовица L-15, содержащей 1%-ную смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) и  $10^{-7}$  М омепразола. После инкубации перед исследованием экспрессии мРНК чешую хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Тотальную РНК выделяли из чешуи с помощью набора для фиброзной ткани «Total RNA extraction kit for fibrous tissue» («MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG», Германия) и использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с использованием набора от «TAKARA Bio Inc.» (Япония). Для определения активности остеокластов и остеобластов мы измеряли экспрессию мРНК RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa\text{B}$ ), OPG (остеопротегерин), факторов регуляции транскрипции TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с TNF-рецептором) и NFATc1 (ядерный фактор активированных Т-клеток цитоплазматический 1) и функциональных генов CTR (рецептор кальцитонина), CTSK (катепсин К), MMP-9 (матриксная металлопептидаза 9) и DC-STAMP (трансмембранный белок, специфичный для дендритных клеток). Экспрессия исследуемых генов бы-

ла нормализована по уровню мРНК гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Используемые в количественной ПЦР праймеры указаны в таблице; температура отжига праймеров составляла  $60^{\circ}\text{C}$ .

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS v.20 («IBM», США). Сравнение полученных значений проведено с использованием *t*-критерия Стьюдента, результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SE). Результат считался статистически значимым при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В нашем исследовании омепразол во всех используемых концентрациях приводил к существенному повышению активности AP и TRAP в чешуе рыб после 6-часовой инкубации ( $p < 0,01$ ; рис. 1, а и б).

По сравнению с контрольной группой омепразол приводил к значительному повышению уровня кальция в плазме крови рыб через 6 и 12 ч ( $p < 0,01$ ) после внутрибрюшинного введения. Спустя 24 ч после инъекции разница между контрольной и опытной группами становилась статистически недостоверной (рис. 2).

Основываясь на том, что омепразол приводил к повышению уровня кальция в крови рыб спустя 6 ч после инъекции, мы решили исследовать паттерны экспрессии генов после инкубации с омепразолом в течение 1, 2, 3 и 6 ч. Инкубация с препаратом в течение 1 и 2 ч не оказала достоверного влияния на экспрессию генов-маркеров остеобластов и остеокластов (рис. S1 и S2 в Приложении).

Инкубация с омепразолом в концентрации  $10^{-7}$  М в течение 3 ч приводила к повышению

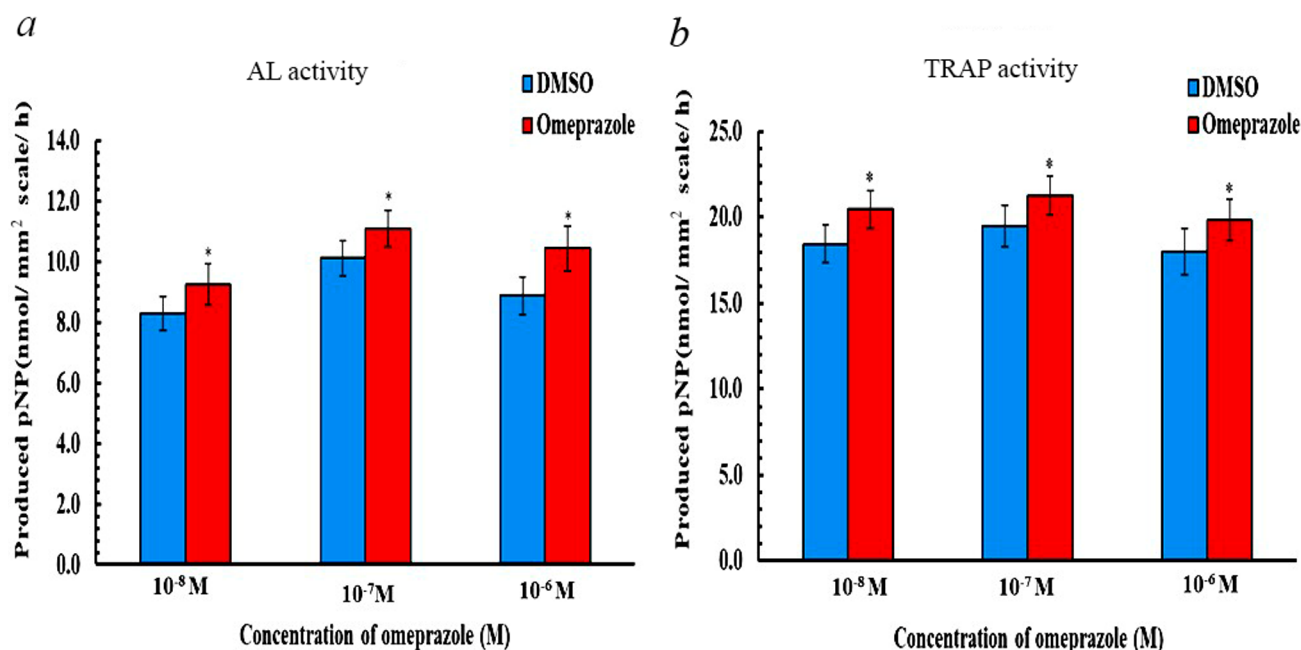


Рис. 1. Влияние омепразола на активность AP (a) и TRAP (b) в чешуе рыбы после 6-часовой инкубации; \* — статистически достоверное различие при  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SE);  $n = 8$  (по одному образцу от каждой рыбы). Синие столбцы — DMSO (контроль), красные — омепразол (omeprazole), pNP — p-Nitrophenol (n-нитрофенол)

экспрессии мРНК *RANKL*, *OPG*, *TRAF6*, *NFATc1*, *CTR*, *CTSK*, *MMP-9* и *DC-STAMP* по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Тем не менее спустя 6 ч инкубации различие в экспрессии между экспериментом и контролем было обнаружено только для гена *NFATc1* ( $p < 0,05$ ) (рис. 3 и 4). Изменения соотношения *RANKL/OPG* через 3 и 6 ч инкубации были статистически недостоверными (рис. S3 в Приложении).

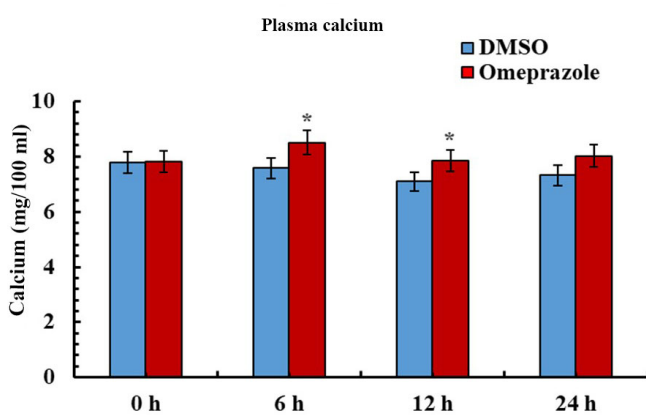


Рис. 2. Концентрация кальция в плазме крови в экспериментальной (омепразол; красные столбцы) и контрольной (DMSO; синие столбцы) группах через 0, 6, 12 и 24 ч после инъекции; \* — статистически достоверное различие при  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SE);  $n = 10$

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ингибиторы протонной помпы обычно применяют в качестве средств, подавляющих кислотность, для лечения желудочно-кишечных расстройств, вызванных действием кислоты, таких как пептические язвы, диспепсия и ГЭРБ [5]. Тем не менее использование ИПП вызывает ряд опасений в связи с возможным проявлением их побочных эффектов, включая повышенный риск переломов, недостаточную регенерацию кости, снижение скорости сращения кости, ухудшение всасывания железа и витамина B12 у мужчин, а также гипомagneмию и инфекции [15, 16].

В ходе настоящего исследования мы обнаружили, что инкубация чешуи золотой рыбки с омепразолом в течение 6 ч приводит к значительному повышению активности как AP, так и TRAP (маркеров остеобластов и остеокластов соответственно). Наши результаты согласуются с результатами проведенных ранее исследований, которые продемонстрировали прямое влияние ИПП на остеокласты и остеобласты [17, 18]. Белок AP представляет собой связанный с плазматической мембраной остеобластов тетрамерный фермент, который играет ключевую роль в образовании и минерализации остеоидов посредством ферментативной деградации пирофосфата (ингибитора минерализации) при

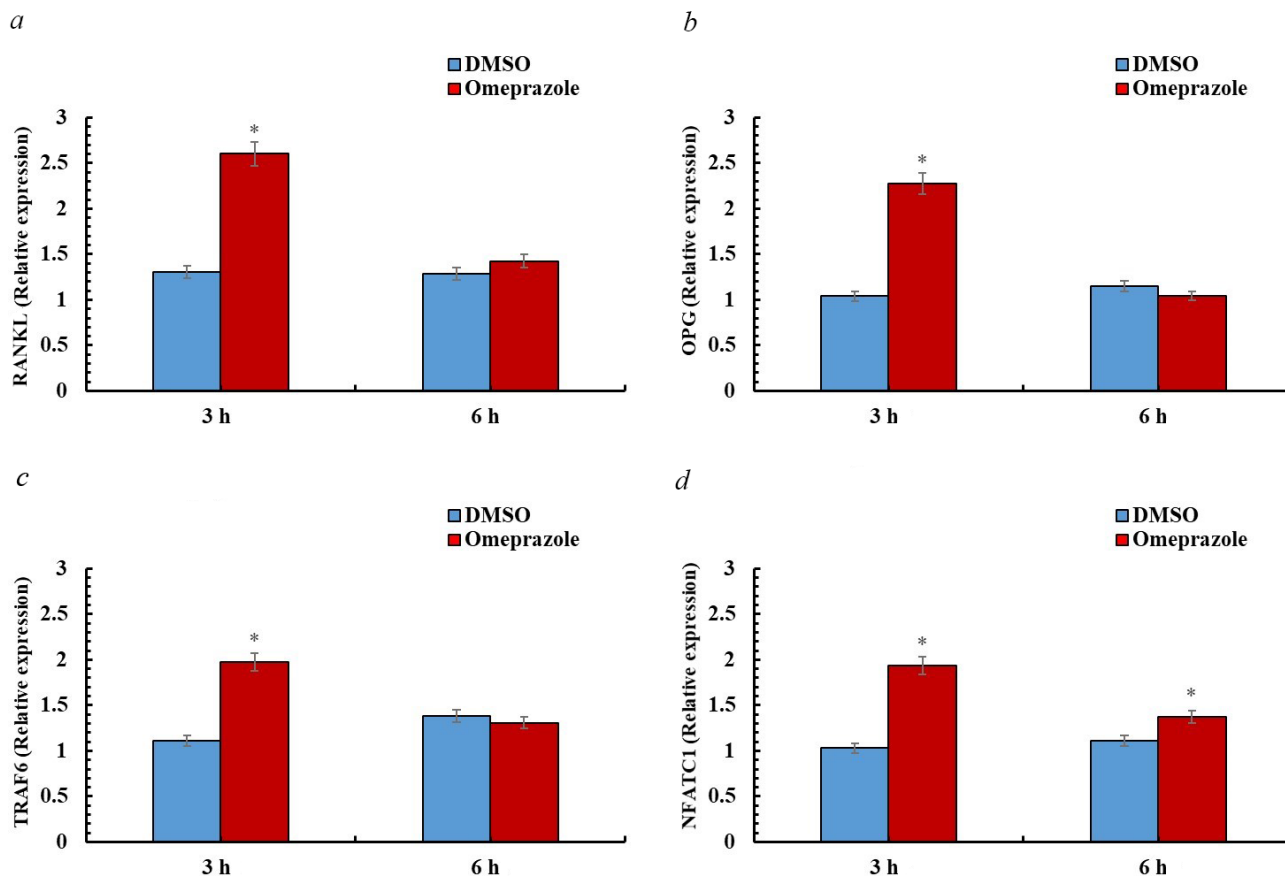


Рис. 3. Относительная экспрессия мРНК в чешуе рыбы, инкубированной с омепразолом ( $10^{-7}$  М; красные столбцы) в течение 3 и 6 ч, и в контрольных образцах (DMSO; синие столбцы): а – RANKL; б – OPG; в – TRAF6; д – NFATc1; \* – статистически достоверное различие при  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SE);  $n = 8$  (по одному образцу от каждой рыбы)

щелочном значении pH [19]. Ранее было обнаружено, что ИПП приводят к значительному повышению выживаемости остеобластов (1–10 мкг/мл пантопразола) и росту активности AP (3–10 мкг/мл пантопразола) в клетках MC3T3-E1, а также повышению уровня остеокальцина (маркера дифференцировки) в остеобластах человека (1–4 мкг/мл омепразола) [17]. Напротив, Costa-Rodrigues et al. [20] отметили выраженное снижение активности AP в культивируемых мезенхимальных стволовых клетках человека на 14-й и 21-й день после инкубации с омепразолом, эзомепразолом и лансопразолом в концентрациях от  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  М. Данные результаты не подтверждают гипотезу о том, что снижение функции остеобластов является основной причиной повышенного риска переломов у пациентов, получавших ИПП.

В отличие от AP, TRAP устойчив к деградации при действии тартрата и обнаруживается в области фестончатого края остеокластов. Его содержание обычно увеличивается при ускоренном метаболизме костной ткани, сопровождаю-

щим такие состояния, как болезнь Педжета, метастазы в кости и множественная миелома [19]. Hyun et al. [21] не обнаружили значительных изменений в количестве TRAP-положительных остеокластоподобных клеток после лечения с применением ИПП. Более того, ИПП ингибировали формирование TRAP-положительных многоядерных клеток в культивируемых мононуклеарных клетках периферической крови на 21-й день инкубирования с омепразолом в концентрациях от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  М [20]. Это несоответствие полученных результатов можно объяснить тем, что ремоделирование кости является чрезвычайно сложным процессом, при котором старые костные клетки заменяются новыми за счет скоординированного взаимодействия компонентов костной ткани [22]. Ни в одном из проведенных ранее исследований не учитывали передачу сигналов и взаимодействие между клетками кости.

В ходе исследования мы обнаружили, что внутрибрюшинное введение омепразола вызывало заметное повышение концентрации каль-

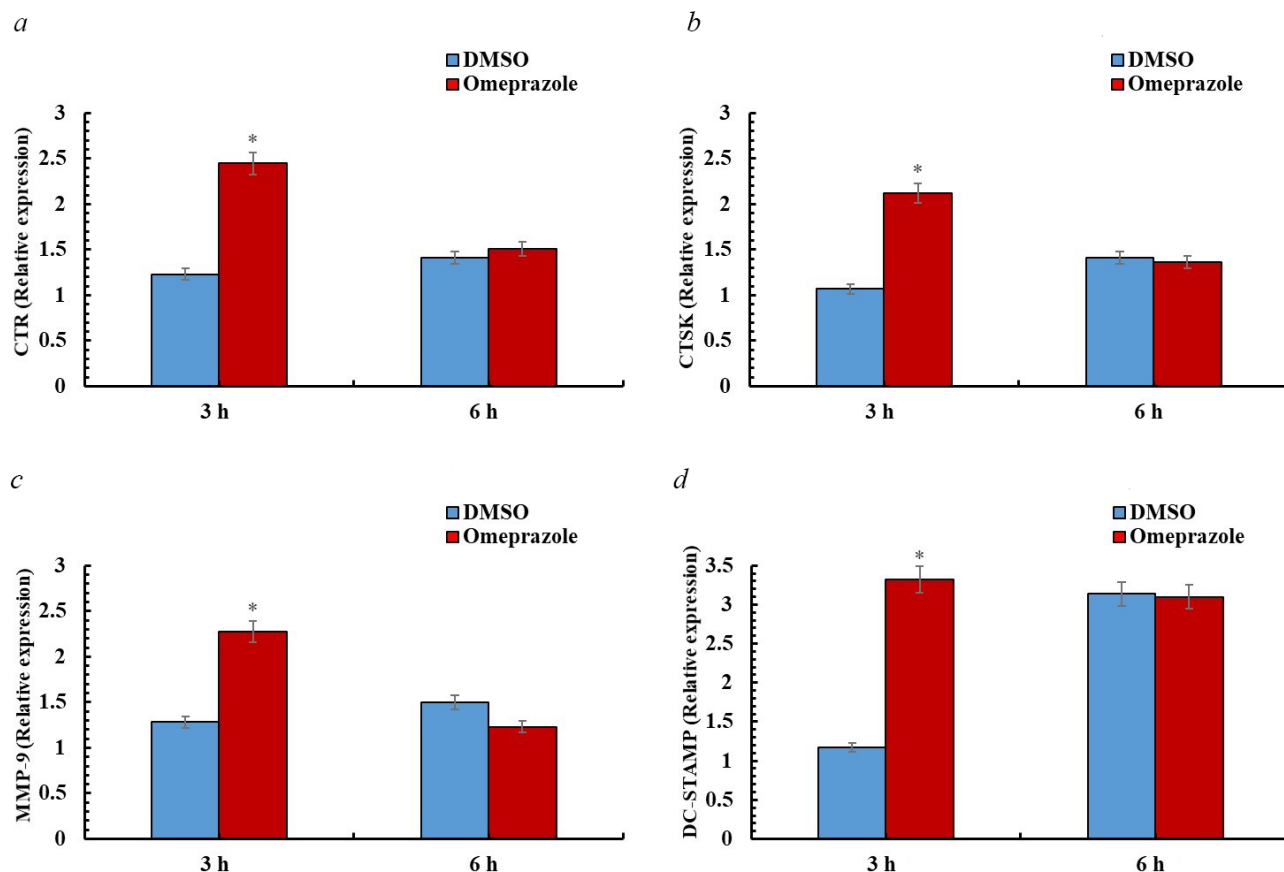


Рис. 4. Относительная экспрессия мРНК в чешуе рыбы, обработанной омепразолом ( $10^{-7}$  М; красные столбцы) в течение 3 и 6 ч, и в контрольных образцах (DMSO; синие столбцы): *a* – CTR; *b* – CTSK; *c* – MMP-9; *d* – DC-STAMP; \* – статистически достоверное различие при  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SE);  $n = 8$  (по одному образцу от каждой рыбы)

ция в плазме рыб через 6 ч после инъекции. Кальций необходим для поддержания микро-структуры костей [23]. Повышенная концентрация кальция в плазме является маркером ускоренной резорбции костной ткани и может наблюдаться при многих заболеваниях, таких как первичный гиперпаратиреоз, рак и заболевания почек [24]. Полученные нами результаты согласуются с результатами Ye et al. [25], которые продемонстрировали, что омепразол (20 мг/день) значительно снижает минеральную плотность костей за счет высвобождения минералов из костной ткани. При приеме не натошак ИПП могут влиять на регенерацию костей за счет повышения pH в тонком кишечнике, что приводит к снижению доступности кальция и ускорению потери минералов костной тканью [26]. Следовательно, снижение всасывания кальция может объяснить связь между применением ИПП и повышением риска переломов костей [27]. Более того, снижение содержания кальция в плазме способствует усилению секреции паратиреоидного гормона паращитовидной железой [28].

Паратгормон мобилизует кальций из костных клеток, что снижает прочность костей и увеличивает риск переломов [29]. Тем не менее в нескольких исследованиях было высказано предположение, что омепразол снижает резорбцию костной ткани и замедляет прогрессирование остеопороза [17, 21]. Таким образом, вопрос о связи между применением ИПП, деминерализацией костей и повышенным риском переломов остается открытым.

В нашем исследовании золотые рыбки не получали корм в течение одного дня. Следовательно, ни контрольная, ни получавшая омепразол группа не имела внешнего источника кальция в составе пищи. В контрольной группе снижение уровня кальция через 12 ч можно интерпретировать как результат голодания. В экспериментальной группе, напротив, наблюдалось повышение уровня кальция в плазме через 6 и 12 ч, что может объясняться действием омепразола на костные клетки, а именно индукцией деминерализации кости и высвобождением кальция, что приводит к резорбции костной

ткани. Известно, что содержание кальция в пресной воде очень мало; следовательно, пресноводные рыбы должны регулировать уровень кальция в плазме крови при помощи чешуи [30], поскольку через жабры концентрация кальция не может быть быстро увеличена. Повышение уровня кальция в крови также может быть индуцировано паратиреоидным гормоном посредством активации остеокластов [31]. Таким образом, весьма вероятно, что омепразол увеличивает уровень кальция в крови за счет активации остеокластов.

Romdhane et al. [32] установили, что ИПП могут действовать непосредственно на костные клетки. Более того, авторы обнаружили, что длительное применение ИПП связано со снижением минеральной плотности костей (МПК). Снижение МПК и изменение микроструктуры кости считаются маркерами остеопороза [5]. Кроме того, ИПП могут вызывать изменения прочности, геометрии, трабекулярного состава и микроархитектуры кости, что может влиять на прогрессирование ее ремоделирования и способствовать переломам костей [27]. ИПП играют жизненно важную роль в метаболизме костей и могут напрямую влиять на их регенерацию [25, 26]. Тем не менее имеющиеся данные о молекулярных механизмах действия ИПП на ремоделирование кости, полученные на культурах клеток, являются противоречивыми, поскольку в таких исследованиях не была учтена передача сигналов между костными клетками.

В настоящем исследовании мы показали, что инкубация рыбьей чешуи с омепразолом в концентрации  $10^{-7}$  М в течение 3 ч вызывала значительную активацию экспрессии мРНК *RANKL* и *OPG*, а также мРНК факторов регуляции транскрипции *TRAF6* и *NFATc1*. Экспрессия мРНК маркеров остеокластов *CTSK*, *CTR*, *MMP-9* и *DC-STAMP* в чешуе, обработанной омепразолом, также была заметно повышена по сравнению с контролем. При этом единственным белком, экспрессия мРНК которого оставалась значительно повышенной после 6-часовой инкубации, был *NFATc1*.

Наши результаты согласуются с результатами работы Hyun et al., где было показано, что омепразол увеличивает активность остеобластов за счет стимуляции экспрессии гена остеокальцина *OCN* и повышения соотношения *OPG/RANKL* в клетках MC3T3-E1. Соотношение *OPG/RANKL* значительно увеличивалось с повышением концентрации омепразола [21]. Hyun et al. также обнаружили, что омепразол приводит к снижению активности остеокластов в клетках RAW 264.7 и подавлению экспрессии

мРНК *c-Fos*, *NFATc1*, *CTR* и *MMP-9* независимо от концентрации препарата. Такой ответ на препарат может приводить к снижению риска переломов [21], что противоречит результатам нашего исследования. Costa-Rodrigues et al. продемонстрировали снижение содержания маркеров остеокластов, в частности *CTSK*, и обнаружили, что активность TRAP связана с резорбтивной активностью при концентрациях ИПП более  $10^{-5}$  М [20]. Тем не менее в нескольких предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что применение ИПП, особенно в высоких дозах и в течение продолжительных периодов времени, не обладало остеопротекторным эффектом; напротив – повышало риск переломов костей [33]. Такое расхождение в результатах, опять же, может быть связано с тем, что при проведении исследований мы принимали во внимание передачу сигналов между костными клетками.

Обнаружено множество молекул, участвующих в передаче сигналов между остеокластами и остеобластами [34]. Белок *RANKL* принадлежит к суперсемейству фактора некроза опухоли  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) и связывается с активатором мембранного рецептора ядерного фактора  $\kappa$ B (*RANK*) из суперсемейства *TNF*-рецепторов [35]. При связывании со своим рецептором (*RANK*, продуцируемым остеокластами), *RANKL* запускает дифференцировку предшественников остеокластов в многоядерные остеокласты (активная форма этого типа клеток) [36]. Взаимодействие между *RANKL* и *RANK* приводит к индукции внутриклеточного сигнального каскада, контролируемого рецептором-ловушкой *OPG*, продуцируемым остеобластами. *OPG* предотвращает связывание *RANKL* с *RANK*, тем самым подавляя остеокластогенез. Таким образом, соотношение *RANK/RANKL/OPG* было использовано в качестве маркера активации остеокластов [37]. В нашем исследовании экспрессия мРНК *RANKL* и *OPG* была значительно повышена, свидетельствуя о том, что омепразол привел к изменению соотношения *RANKL/OPG*. Кроме того, экспрессия генов остеокластов также была значительно повышена, указывая на то, что омепразол вызывает резорбцию, но не формирование кости (что также проявляется в усилении высвобождения кальция).

Подобно другим рецепторам суперсемейства *TNFR*, *RANK* не обладает тирозинкиназной активностью, которая необходима для активации последующих в сигнальном пути (downstream) молекул [38]. Следовательно, для индукции сигнального каскада *RANK* нуждается во взаимодействии с адаптерными белками (например, *TRAF6*) [36]. Исследования на мышах с дефици-

том TRAF6 показали, что он является основным адаптерным белком, который играет решающую роль в проведении сигнала по путям, активируемым RANKL [39], а также в инициации последующего сигнального каскада, который характеризуется индукцией митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), ядерного фактора  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) и белка-активатора 1 (AP-1) [40].

Активированный NF- $\kappa$ B инициирует работу NFATc1, который играет важную роль в остеокластогенезе [36]. Более того, на промежуточной стадии передачи костимулирующий сигнал инициирует флуктуацию ионов кальция, опосредованную активацией фосфолипазы C  $\beta$ 2 (PLC  $\beta$ 2). Совместно с комплексом c-Fos/AP-1 кальциевый сигнал опосредует стабильную выработку NFATc1 [41]. Эти процессы, предположительно, объясняют заметное увеличение содержания NFATc1 после инкубации чешуи с омепразолом в течение 3 и 6 ч. Наши результаты согласуются с данными Takayanagi et al. [42], где было продемонстрировано, что NFATc1 является основным фактором транскрипции в остеокластогенезе, а также с результатами группы Lee et al., которые обнаружили, что большинство белков NFAT в Т-клетках контролируется поступлением кальция [43]. Кальмодулин связывает свободные ионы кальция и активирует кальциневрин, который дефосфорилирует множество остатков серина в NFAT, что приводит к транслокации этих белков в ядро. Стоит отметить, что NFATc1 активируется по типу аутоамплификации после стимуляции при помощи RANKL [44].

В результате передачи сигнала NFATc1 перемещается в ядро, где он взаимодействует с другими факторами транскрипции и связывается с ДНК, повышая экспрессию генов-мишеней NFATc1, таких как *CTSK*, *TRAP* и *DC-STAMP* [37, 45]. С соответствующих мРНК синтезируются белки, ответственные за резорбцию кости, в ходе которой происходит дифференцировка, слияние и собственно функционирование остеокластов [36]. Эти результаты согласуются с полученными нами данными, демонстрирующими повышенную экспрессию мРНК *CTR*, *CTSK* и *DC-STAMP* в экспериментальной группе (с добавлением омепразола) по сравнению с контролем после 3-часовой инкубации. Данный факт может быть связан с тем, что DC-STAMP и остеокласт-стимулирующий трансмембранный белок (OC-STAMP) необходимы для слияния остеокластов, но не для их дифференцировки [40].

Следовательно, DC-STAMP и OC-STAMP рассматриваются как мишени NFATc1 в остеокластах [46]. Podgorski et al. [45] продемонстрировали, что избыточная экспрессия *CTSK* с одновременной секрецией провоспалительных цитокинов может опосредовать механизм прогрессирования заболеваний костей при участии *CTSK*, что согласуется с нашей гипотезой. Кроме того, полученные нами результаты согласуются с результатами работы Herroon et al. [47], в которой была продемонстрирована ключевая функция *CTSK* в развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний костей в дополнение к резорбции кости.

Таким образом, с целью объяснения расхождений в описанных эффектах омепразола на метаболизм костей, в настоящем исследовании мы использовали новый метод анализа *in vitro* с использованием рыбьей чешуи, а также *in vivo* исследования. Мы обнаружили, что омепразол оказывает значительное влияние на функционирование системы OPG/RANKL. Кроме того, омепразол способен взаимодействовать с костными клетками и приводить к повышению экспрессии основного фактора транскрипции, NFATc1, который дополнительно стимулируется высвобождением кальция, что приводит к активации функциональных генов остеокластов (*MMP-9*, *CTSK*, *DC-STAMP* и *CTR*) и, в конечном итоге, к стимуляции резорбции кости.

**Благодарности.** Мы благодарны всем сотрудникам Морской лаборатории Ното Отдела экологических исследований морской среды Института природы и экологических технологий университета Канадзавы (Ното-Чо, Исигава, Япония) за их неоценимую поддержку в продолжение всего нашего исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соответствие этическим стандартам.** Эксперимент проводился в соответствии с инструкциями по уходу и работе с лабораторными животными университета Канадзавы (протокол № 93255).

**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](http://www.springer.com/journal/10541)), том 86, вып. 10, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kinoshita, Y., Ishimura, N., and Ishihara, S. (2018) Advantages and disadvantages of long-term proton pump inhibitor use, *J. Neurogastroenterol. Motil.*, **24**, 182-196.
- Tian, H., Xu, Y., Wang, J., Tian, W., Sun, J., et al. (2018) Effects of plasma albumin on the pharmacokinetics of esomeprazole in ICU patients, *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 6374374, doi: 10.1155/2018/6374374.
- Yanagihara, G. R., de Paiva, A. G., Neto, M. P., Torres, L. H., Shimano, A. C., et al. (2015) Effects of long-term administration of omeprazole on bone mineral density and the mechanical properties of the bone, *Rev. Bras. Ortop.*, **50**, 232-238.
- Thaler, H. W., Sterke, C. S., and Van Der Cammen, T. J. M. (2016) Association of proton pump inhibitor use with recurrent falls and risk of fractures in older women: a study of medication use in older fallers, *J. Nutr. Health Aging*, **20**, 77-81.
- Thong, B. K. S., Ima-Nirwana, S., and Chin, K. Y. (2019) Proton pump inhibitors and fracture risk: A review of current evidence and mechanisms involved, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **16**, 1571.
- FDA Drug Safety Communication (2011) Possible increased risk of fractures of the hip, wrist, and spine with the use of proton pump inhibitors, Update: 3/23/2011. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/fda-drug-safety-communication-possible-increased-risk-fractures-hip-wrist-and-spine-use-proton-pump>.
- Andersen, T. L., Sondergaard, T. E., Skorzynska, K. E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T. L., et al. (2009) A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone, *Am. J. Pathol.*, **174**, 239-247.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., and Cerri, P. S. (2015) Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells, *Biomed Res. Int.*, **2015**, 421746, doi: 10.1155/2015/421746.
- Zohar, R. (2012) Signals between cells and matrix mediate bone regeneration, in: *Bone Regeneration*, Haim Tal, IntechOpen, doi: 10.5772/38292.
- Manolagas, S. C. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr. Rev.*, **21**, 115-137.
- Suzuki, N., Suzuki, T., and Kurokawa, T. (2000) Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (sea-water teleost), *Peptides*, **21**, 115-124.
- Thamamongkood, T. A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N., and Hattori, A. (2012) Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and autotransplantation of goldfish scale: a new tool to study intramembranous bone regeneration, *Bone*, **50**, 1240-1249.
- Briganti, S. I., Naciu, A. M., Tabacco, G., Cesareo, R., Napoli, N., et al. (2021) Proton pump inhibitors and fractures in adults: a critical appraisal and review of the literature, *Int. J. Endocrinol.*, doi: 10.1155/2021/8902367.
- Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., et al. (2007) Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone, *Adv. Sp. Res.*, **40**, 1711-1721.
- Al Subaie, A., Emami, E., Tamimi, I., Laurenti, M., Eimar, H., et al. (2016) Systemic administration of omeprazole interferes with bone healing and implant osseointegration: an *in vivo* study on rat tibiae, *J. Clin. Periodontol.*, **43**, 193-203.
- Wang, L., Li, M., Cao, Y., Han, Z., Wang, X., et al. (2017) Proton pump inhibitors and the risk for fracture at specific sites: data mining of the FDA adverse event reporting system, *Sci. Rep.*, **7**, 5527.
- Prause, M., Seeliger, C., Unger, M., van Griensven, M., and Haug, A. T. (2014) Pantoprazole increases cell viability and function of primary human osteoblasts *in vitro*, *Injury*, **45**, 1156-1164.
- Prause, M., Seeliger, C., Unger, M., Rosado Balmayor, E., van Griensven, M., and Haug, A. T. (2015) Pantoprazole decreases cell viability and function of human osteoclasts *in vitro*, *Mediators Inflamm.*, **2015**, 413097, doi: 10.1155/2015/413097.
- Shetty, S., Kapoor, N., Bondu, J. D., Thomas, N., and Paul, T. V. (2016) Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis, *Ind. J. Endocrinol. Metab.*, **20**, 846-852.
- Costa-Rodrigues, J., Reis, S., Teixeira, S., Lopes, S., and Fernandes, M. H. (2013) Dose-dependent inhibitory effects of proton pump inhibitors on human osteoclastic and osteoblastic cell activity, *FEBS J.*, **280**, 5052-5064.
- Hyun, J. J., Chun, H. J., Keum, B., Seo, Y. S., Kim, Y. S., et al. (2010) Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts, *Int. J. Mol. Med.*, **26**, 877-883.
- Robling, A. G., Castillo, A. B., and Turner, C. H. (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 455-498.
- Price, C. T., Langford, J. R., and Liporace, F. A. (2012) Essential nutrients for bone health and a review of their availability in the average North American Diet, *Open Orthop. J.*, **6**, 143-149.
- Minisola, S., Pepe, J., Piemonte, S., and Cipriani, C. (2015) The diagnosis and management of hypercalcaemia, *BMJ*, **350**, h2723, doi: 10.1136/bmj.h2723.
- Ye, X., Liu, H., Wu, C., Qin, Y., Zang, J., et al. (2011) Proton pump inhibitors therapy and risk of hip fracture: a systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23**, 794-800.
- O'Connell, M. B., Madden, D. M., Murray, A. M., Heaney, R. P., and Kerzner, L. J. (2005) Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial, *Am. J. Med.*, **118**, 778-781.
- Wu, X., Al-Abedalla, K., Abi-Nader, S., Daniel, N. G., Nicolau, B., and Tamimi, F. (2017) Proton pump inhibitors and the risk of osseointegrated dental implant failure: a cohort study, *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.*, **19**, 222-232.
- Goltzman, D., Mannstadt, M., and Marcocci, C. (2018) Physiology of the calcium-parathyroid hormone-vitamin D axis, *Front. Horm. Res.*, **50**, 1-13.
- Moe, S. M. (2008) Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium, *Primary Care*, **35**, 215-237.
- Suzuki, N., Kitamura, K., and Hattori, A. (2016) Fish scale is a suitable model for analyzing determinants of skeletal fragility in type 2 diabetes, *Endocrine*, **54**, 575-577.
- Suzuki, N., Danks, J. A., Maruyama, Y., Ikegame, M., Sasayama, Y., et al. (2011) Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish, *Bone*, **48**, 1186-1193.
- Romdhane, H., Ayadi, S., Elleuch, N., and Abdelghani, K. (2018) Effect of long-term proton pump inhibitors on bone mineral density, *Tunis Med.*, **96**, 193-197.
- Corley, D. A., Kubo, A., Zhao, W., and Quesenberry, C. (2010) Proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists are associated with hip fractures among at-risk patients, *Gastroenterology*, **139**, 93-101.

34. Nassar, Y., and Richter, S. (2018) Proton-pump inhibitor use and fracture risk: an updated systematic review and meta-analysis, *J. Bone Metab.*, **25**, 141-151.
35. Sims, N. A., and Martin, T. J. (2014) Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit, *Bonekey Rep.*, **3**, 481.
36. Park, J. H., Lee, N. K., and Lee, S. Y. (2017) Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation, *Mol. Cells*, **40**, 706-713.
37. Lacey, D. L., Boyle, W. J., Simonet, W. S., Kostenuik, P. J., Dougall, W. C., et al. (2012) Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 401-419.
38. Liu, W., and Zhang, X. (2015) Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review), *Mol. Med. Rep.*, **11**, 3212-3218.
39. Walsh, M. C., Lee, J., and Choi, Y. (2015) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system, *Immunol. Rev.*, **266**, 72-92.
40. Kobayashi, Y., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2009) Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **19**, 61-72.
41. Asagiri, M., and Takayanagi, H. (2007) The molecular understanding of osteoclast differentiation, *Bone*, **40**, 251-264.
42. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., et al. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts, *Dev. Cell*, **3**, 889-901.
43. Lee, J. U., Kim, L. K., and Choi, J. M. (2018) Revisiting the concept of targeting NFAT to control T cell immunity and autoimmune diseases, *Front. Immunol.*, **9**, 2747.
44. Hutchings, G., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Sibiak, R., et al. (2020) Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials, *J. Clin. Med.*, **9**, 139, doi: 10.3390/jcm9010139.
45. Podgorski, I., Linebaugh, B. E., Koblinski, J. E., Rudy, D. L., Herroon, M. K., et al. (2009) Bone marrow-derived cathepsin K cleaves SPARC in bone metastasis, *Am. J. Pathol.*, **175**, 1255-1269.
46. Chiu, Y. H., and Ritchlin, C. T. (2016) DC-STAMP: a key regulator in osteoclast differentiation, *J. Cell Physiol.*, **231**, 2402-2407.
47. Herroon, M. K., Rajagurubandara, E., Rudy, D. L., Chalasani, A., Hardaway, A. L., and Podgorski, I. (2013) Macrophage cathepsin K promotes prostate tumor progression in bone, *Oncogene*, **32**, 1580-1593.

## EFFECT OF OMEPRAZOLE ON OSTEOBLASTS AND OSTEOCLASTS *in vivo* AND IN THE *in vitro* MODEL USING FISH SCALES

M. I. Zanaty<sup>1</sup>, A. Abdel-Moneim<sup>2\*</sup>, Y. Kitani<sup>3</sup>, T. Sekiguchi<sup>3</sup>, and N. Suzuki<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology and Life Sciences Department, Faculty of Postgraduate Studies  
for Advanced Sciences, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt

<sup>2</sup> Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University,  
62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel\_men2020@yahoo.com

<sup>3</sup> Noto Marine Laboratory, Division of Marine Environmental Studies, Institute of Nature  
and Environmental Technology, Kanazawa University, Noto-Cho, 927-0553 Ishikawa, Japan

Omeprazole suppresses excessive secretion of gastric acid *via* irreversible inhibition of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the gastric parietal cells. Recent meta-analysis of data revealed an association between the use of proton pump inhibitors (PPIs) and increased risk of bone fractures, but the underlying molecular mechanism of PPI action remains unclear. In this study, we demonstrated that omeprazole directly influences bone metabolism using a unique *in vitro* bioassay system with teleost scales, as well as the *in vivo* model. The *in vitro* study showed that omeprazole significantly increased the activities of alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase after 6 h of incubation with this PPI. Expression of mRNAs for several osteoclastic markers was upregulated after 3-h incubation of fish scales with 10<sup>-7</sup> M omeprazole. The *in vivo* experiments revealed that the plasma calcium levels significantly increased in the omeprazole-treated group. The results of *in vitro* and *in vivo* studies suggest that omeprazole affects bone cells by increasing bone resorption by upregulating expression of osteoclastic genes and promoting calcium release to the circulation. The suggested *in vitro* bioassay in fish scales is a practical model that can be used to study the effects of drugs on bone metabolism.

**Keywords:** omeprazole, fish scales, transcription genes, osteoclastic genes

УДК 577.214.43

## ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗАХВАТЕ ИМИ ОКИСЛЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

© 2021 Е.В. Некрасова<sup>1</sup>, Е.Е. Ларионова<sup>1</sup>, К. Данько<sup>2</sup>, Д.О. Кузьмина<sup>2</sup>,  
В.С. Шавва<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>1</sup>, С.В. Орлов<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, 197376 Санкт-Петербург, Россия;  
электронная почта: serge@iem.sp.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия;  
электронная почта: s.orlov@spbu.ru

Поступила в редакцию 01.07.2021

После доработки 18.07.2021

Принята к публикации 23.07.2021

Аполипопротеин А-I (АроА-I) является ключевым компонентом системы обратного транспорта холестерина человека. В предыдущих исследованиях мы показали экспрессию гена *apoA-I* в моноцитах и макрофагах человека на уровне мРНК и белка. В отличие от гепатоцитов и энтероцитов, где регуляция экспрессии гена *apoA-I* изучена достаточно подробно, данных о регуляции экспрессии *apoA-I* в макрофагах крайне мало. Ничего не известно о динамике экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах при захвате модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) – одном из ключевых процессов на ранних стадиях атерогенеза, приводящего к образованию пенных клеток. В данной работе мы показываем сложный характер динамики экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека при захвате окисленных ЛПНП (оксЛПНП). В первые 24 ч инкубации макрофагов с оксЛПНП наблюдается индукция экспрессии гена *apoA-I* на уровне мРНК и белка, тогда как через 48 ч экспрессия *apoA-I* оказывается подавленной. Оба эффекта зависят от взаимодействия оксЛПНП с рецептором TLR4 и не связаны непосредственно с захватом оксЛПНП макрофагами. Подавление экспрессии *apoA-I* после инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч зависит от активации MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK, а также фактора транскрипции NF-κB.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** атеросклероз, оксЛПНП, макрофаги, TNP-1, пенные клетки, рецептор TLR4, регуляция экспрессии генов, ген *apoA-I*.

DOI: 10.31857/S0320972521100031

### ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз представляет собой хроническое системное заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, возникающее вследствие нарушения липидного и белкового обмена и сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеинов

в интиму сосудов [1]. Аполипопротеин А-I (АроА-I) является ключевым компонентом системы обратного транспорта холестерина человека. Этот белок, будучи главным компонентом липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), способствует выходу холестерина из тканей, поступлению его в печень для последующего окисления и выведения из организма [2]. Помимо участия в обратном транспорте холестерина, АроА-I функционирует в качестве кофактора лецитин-холестеринацилтрансферазы [3], проявляет антиоксидантные свойства [4], а также способен ограничивать воспалительные реакции. В частности, показана способность АроА-I блокировать активацию макрофагов Т-лимфоцитами и ограничивать продукцию TNFα и интерлейкина 1β (IL-1β) [5–6]. АроА-I угнетает также другой провоспалительный фактор – С-реактивный белок [7]. С другой стороны, АроА-I является негативным показателем острой фазы воспалительного отве-

Принятые сокращения: АроА-I – аполипопротеин А-I; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; оксЛПНП – окисленные липопротеины низкой плотности; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; BSA – бычий сывороточный альбумин; FCS – эмбриональная телячья сыворотка; LPS – липополисахарид; PBS – фосфатно-солевой буфер; PMA – фобол-12-миристан-13-ацетат (используется в моделях канцерогенеза как активатор дифференцирования и/или апоптоза); TBARS – соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; TNP-1 – клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека; TNFα – фактор некроза опухоли α.

\* Адресат для корреспонденции.

та — при развитии воспаления экспрессия гена *apoA-I* в печени и тонком кишечнике резко снижается, а циркулирующий в плазме крови белок ApoA-I вытесняется из ЛПВП сывороточным амилоидом и разрушается сывороточными протеазами [5]. К настоящему времени также установлено, что главным транспортёром холестерина к местам синтеза стероидных гормонов в стероидогенные ткани и органы млекопитающих (включая человека) являются ЛПВП, а белок, контролирующий этот процесс — ApoA-I [8].

Основными местами синтеза ApoA-I у человека являются печень и тонкий кишечник [9]. В предыдущих исследованиях мы показали экспрессию гена *apoA-I* в моноцитах и макрофагах человека на уровне мРНК и белка, однако вопрос о функциях ApoA-I в этих клетках остаётся открытым [10–12]. Установлено, что эндогенный ApoA-I макрофагов обладает противовоспалительной активностью — блокирование синтеза ApoA-I методом РНК-интерференции приводило к усилению синтеза и секреции TNF $\alpha$ , повышению уровня экспрессии рецептора липополисахарида (LPS) TLR4 и усилению воспалительного ответа макрофагов на LPS [10]. Кроме того, в отличие от гепатоцитов, где секреция ApoA-I приводит к формированию ЛПВП плазмы крови, в макрофагах секретруемый ApoA-I остаётся связанным с внешней поверхностью цитоплазматической мембраны (поверхностный ApoA-I макрофагов). Это связывание в значительной степени обусловлено взаимодействием ApoA-I с кассетным транспортёром ABCA1. Более того, уровень ABCA1 в макрофагах сильно коррелирует с уровнем поверхностного ApoA-I, и блокирование синтеза ApoA-I приводит к снижению уровня ABCA1 [10]. Существенный интерес представляют литературные данные об антиатерогенной роли экспрессии гена *apoA-I* человека после его переноса в макрофаги мыши с помощью вирусных векторов. В экспериментах на нокаутных по гену *apoA-I* (*apoA-I*<sup>-/-</sup>) мышам было показано, что доставка в макрофаги вектора экспрессии гена *apoA-I* человека уменьшает развитие жировых полосок на стенках артерий и увеличивает обратный транспорт холестерина из макрофагов в печень [13]. Доставка *apoA-I*<sup>-/-</sup> мышам клеток костного мозга, дефицитных по гену *apoE* (*apoE*<sup>-/-</sup>) и инфицированных ретровирусным вектором экспрессии гена *apoA-I* человека, приводила к значительному уменьшению площади атеросклеротических поражений аорты [14–15]. Аналогичные данные получены при доставке лентивирусных векторов экспрессии *apoA-I* человека в макрофаги мышей [16].

Таким образом, имеющиеся в литературе данные указывают на важную антиатерогенную роль обнаруженной нами экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах.

Ген *apoA-I* имеет три промотора. Структура классического промотора содержит ТАТА-бокс, находящийся в положении –39 п.н. от начала транскрипции. Собственно промотор располагается в положении от –41 до +1 по отношению к месту начала транскрипции [17, 18]. Проксимальный альтернативный промотор имеет точку начала транскрипции в положении –153 п.н., а дистальный альтернативный промотор — в положении –353 п.н. по отношению к точке начала транскрипции с классического промотора *apoA-I* [19]. Гепатоцитарный энхансер контролирует экспрессию гена *apoA-I* в печени. Он имеет координаты (–222; –110) [17] и включает в себя три сайта: А (–214; –192), В (–169; –146) и С (–134; –119) [18]. В гепатоцитах сайты А и С связывают репрессоры активности гена *apoA-I* LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  [20], ARP1 [21], PPAR $\gamma$  [22] и активаторы экспрессии гена *apoA-I* HNF4 $\alpha$  [23], RXR $\alpha$  [24], PPAR $\alpha$  [25]. HNF3 $\beta$  (FOXA2) [26] и FOXO1 [27, 28] связываются с сайтом В.

В отличие от гепатоцитов и энтероцитов, где регуляция экспрессии гена *apoA-I* изучена достаточно подробно, данных о регуляции экспрессии *apoA-I* в макрофагах крайне мало. В макрофагах активен только классический промотор гена *apoA-I* [10]. Ранее мы показали, что TNF $\alpha$  и условия гипоксии вызывают индукцию транскрипции гена *apoA-I* в макрофагах как на уровне РНК, так и на уровне белка [10–12]. Интересно, что по сравнению с гепатоцитами в макрофагах наблюдался «зеркальный» характер регуляции — позитивный в гепатоцитах регулятор транскрипции *apoA-I*, PPAR $\alpha$ , в макрофагах действует как репрессор, тогда как другие ядерные рецепторы (LXR $\alpha$  и LXR $\beta$ ), угнетающие транскрипцию гена *apoA-I* в гепатоцитах, в макрофагах активируют экспрессию *apoA-I* [11].

Повышенная концентрация липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и связанного с ними холестерина в плазме крови является одним из основных факторов риска развития ишемической болезни сердца — клинического проявления атеросклероза [29]. Попадая в интиму артерий, ЛПНП задерживаются там благодаря взаимодействию с отрицательно заряженными компонентами внеклеточного матрикса (гепарансульфатами) и подвергаются окислению под действием свободных радикалов, ферментов миелопероксидаз и липоксигеназ, что приводит к образованию окисленных форм ЛПНП (оксЛПНП) [30]. Появление в интиме оксЛПНП

активирует эндотелий [31], что ведёт к усилению миграции в интиму моноцитов, где они дифференцируются в макрофаги и активно захватывают оксЛПНП с помощью скевенджер-рецепторов, таких как SR-A, CD36, SR-B1, LOX1 и др. Неконтролируемый захват оксЛПНП макрофагами приводит к накоплению в клетках липидных вакуолей (расширений эндоплазматического ретикулула (ЭПР)), содержащих эфиры холестерина, и превращению макрофагов в пенистые клетки — основной клеточный элемент атеросклеротических бляшек [32, 33]. Помимо захвата макрофагами, оксЛПНП обладают и сигнальными функциями. В литературе имеются противоречивые данные о способности оксЛПНП запускать сигнальные каскады в моноцитах и макрофагах. Ряд исследователей утверждает, что оксЛПНП взаимодействуют с комплексом рецепторов CD36–TLR2–TLR4 [34], или CD36–TLR6–TLR4 [35], или TLR4–DC–SIGN [36], и это взаимодействие приводит к запуску воспалительного ответа в макрофагах и к усилению захвата макрофагами оксЛПНП. С другой стороны, существуют данные, согласно которым провоспалительная активность оксЛПНП объясняется примесями эндотоксина, тогда как свободные от эндотоксина оксЛПНП, наоборот, угнетают синтез провоспалительных цитокинов макрофагами [37, 38].

Ничего не известно о регуляции гена *apoA-I* в макрофагах при захвате оксЛПНП — одном из ключевых процессов на ранних стадиях атерогенеза, приводящих к образованию пенистых клеток. В данной работе мы показываем сложный характер динамики экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека при захвате окисленных ЛПНП. В первые 24 ч инкубации макрофагов ТНР-1 (клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека) с оксЛПНП наблюдается индукция экспрессии гена *apoA-I* на уровне мРНК и белка, тогда как через 48 ч экспрессия *apoA-I* оказывается подавленной. Оба эффекта зависят от взаимодействия оксЛПНП с рецептором TLR4 и не связаны непосредственно с захватом оксЛПНП макрофагами. Подавление экспрессии *apoA-I* после инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч зависит от активации MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK, но не p38, а также фактора транскрипции NF-κB.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры и макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека.** Клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека ТНР-1 получена из кол-

лекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FCS, «HyClone Laboratories», США). Дифференцировку моноцитов ТНР-1 в макрофаги индуцировали, добавляя в культуральную среду фобол-12-миристан-13-ацетат (РМА) до концентрации 50 нг/мл (81 нМ) на 24 ч. Затем клетки отмывали от РМА, меняли среду на свежую RPMI-1640, содержащую 10% FCS, и продолжали дифференцировку в течение 48 ч. Таким образом, общее время дифференцировки макрофагов ТНР-1 составляло трое суток для экспериментов по инкубации с оксЛПНП в течение 24 ч и четверо суток — для экспериментов по инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч.

Консервированную донорскую кровь непригодную для переливания закупали на станции переливания крови в охлаждённом виде (Санкт-Петербург, Россия). Доноры подписывали информированное добровольное согласие. Для получения первичных макрофагов производили выделение мононуклеаров из крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла, как описано ранее [39]. Для этого в пробирки (50 мл) наливали 15 мл раствора фиколла плотностью 1,077 («Биолот»), сверху наслаивали 35 мл крови и центрифугировали (30 мин, 2000 об./мин., 18 °C), используя центрифугу Z400K («Hermle Labortechnik», Германия). Далее на границе фаз отбирали слой, содержащий мононуклеарные клетки, и дважды отмывали раствором Хенкса. Осадок ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS, разливали по лункам планшетов (по 100 тыс. клеток в лунку 96-луночного планшета) и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч для адгезии моноцитов. Далее проводили отмывку моноцитов от не прикрепившихся к субстрату клеток (лимфоциты) в растворе Хенкса, к отмывым моноцитам добавляли свежую культуральную среду RPMI-1640, содержащую 10% FCS, и проводили дифференцировку моноцитов в макрофаги при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 (в экспериментах по инкубации с оксЛПНП в течение 24 ч) или 6 (в экспериментах по инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч) суток.

**Антитела, ингибиторы.** Для детекции поверхностного белка ApoA-I использовали мышиные моноклональные антитела против ApoA-I человека («Bio-Rad», США) и вторичные кроличьи антитела F(ab')<sub>2</sub> против IgG мыши, меченые флуорофором Alexa 647 («Abcam», Великобритания). Блокирование рецептора TLR4 прово-

дили с помощью козьих поликлональных анти-тел против TLR4 человека («R&D Systems», США). В работе использованы ингибиторы основных MAP-киназных каскадов и NF- $\kappa$ B («Biomol», Германия): U0126, ингибитор MEK1/2; SB203580, ингибитор киназ p38; SP600125, ингибитор киназ JNK; QNZ, ингибитор фактора транскрипции NF- $\kappa$ B и TO901317, синтетический агонист ядерных рецепторов LXR $\alpha$  и LXR $\beta$ .

**Выделение, окисление и флуоресцентное мечение ЛПНП.** Человеческие ЛПНП выделяли из плазмы, полученной из консервированной донорской крови. Для исключения возможной контаминации клеток экзогенным человеческим AroA-I в работе также использовали ЛПНП, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота. Выделение проводили с помощью последовательного препаративного ультрацентрифугирования, как описано ранее [40]. Использовали ультрацентрифугу Beckman Coulter Optima LE80K («Beckman Coulter», США). К человеческой плазме либо к сыворотке крови крупного рогатого скота («Биолот») добавлялся NaBr до плотности 1,019. Плазму либо сыворотку центрифугировали 18 ч при температуре 12 °C в роторе 50.3 Ti при 40 000 об./мин, после чего верхнюю фазу, состоящую из липопротеинов очень низкой плотности, удаляли. Плотность доводили до 1,064 добавлением NaBr. Образец центрифугировали 22 ч при тех же условиях, после чего верхнюю фазу, состоящую из ЛПНП, изолировали. Полученные ЛПНП диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,6) 24 ч при 4 °C. Концентрацию белка измеряли по методу Лоури [40]. Окисление ЛПНП проводили, как описано в работе Jialal и Chait [41]. К раствору ЛПНП в PBS добавляли раствор CuSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 5 мкМ и инкубировали в условиях доступа кислорода воздуха при 37 °C в течение 18 ч. Далее последовательно проводили два диализа против PBS по 24 ч при 4 °C. При втором диализе для удаления остаточных следов ионов меди к PBS добавляли хелатирующий агент ЭДТА до концентрации 0,5 мМ. Степень окисления ЛПНП определяли методом измерения концентраций соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS) [42]. Образцы (100 мкл, концентрация белка 2–4 мг/мл) инкубировали с 0,5 мл 20%-ной уксусной кислоты, pH 3,5 и 0,5 мл 0,78%-ного водного раствора тиобарбитуровой кислоты. После нагревания при 95 °C в течение 45 мин образцы центрифугировали (4000 об./мин, 5 мин («Eppendorf», США)). Поглощение полученного красного пигмента надосадочной жид-

кости измеряли при длине волны 532 нм. Калибровочную кривую строили с использованием малональдегида бис(диметил ацетала) в качестве источника малонового альдегида, как описано в работе Esterbauer и Cheeseman [43]. Для использованных в работе препаратов оксЛПНП значения TBARS находились в диапазоне 30–45 нмоль/мг белка (TBARS для нативных ЛПНП составлял 7–15 нмоль/мг белка). Флуоресцентное мечение ЛПНП проводили до окисления с помощью тетрафторфенилового эфира фотостабильного гидрофильного красителя Alexa 488 («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Для исключения эффектов возможной бактериальной контаминации использованных препаратов оксЛПНП во всех экспериментах с оксЛПНП к клеткам добавляли полимиксин В («Sigma», США) – агент, связывающий и инактивирующий бактериальный LPS.

**Контроль формирования пенных клеток.** Макрофаги THP-1 трижды промывали PBS, фиксировали в растворе 4%-ного формальдегида на PBS в течение 10 мин, промывали 60%-ным изопропанолом, окрашивали 10 мин в 3%-ном растворе Oil Red O («Sigma»), приготовленном на 60%-ном изопропанол. После отмывки 60%-ным изопропанолом клетки дополнительно окрашивали гематоксилином в течение 2 мин. Далее клетки трижды отмывали в PBS и оценивали число липидных вакуолей в клетках на микроскопе Zeiss Axiovert 40CFL («Zeiss», Германия).

**Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.** Тотальную РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента RNA STAT-60 («Tel-Test», США) в соответствии с инструкциями изготовителя. Остатки геномной ДНК удаляли обработкой ДНКазой I, свободной от РНКаз («Roche Applied Science», Швейцария) в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 2 мМ с последующей инактивацией ДНКазы I прогреванием при 70 °C в течение 15 мин. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy 2 («BioTek», США). Отношение поглощения при длинах волн 260 и 280 нм было выше 2, и отношение поглощения при 260 и 230 нм было выше 1,7. Отсутствие деградации РНК проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле по сохранению целостности рибосомных РНК. Для проведения реакции обратной транскрипции брали равное количество РНК для всех точек. Реакцию обратной транскрипции (с 1 мкл

тотальной РНК) проводили с использованием праймеров oligo-dT и специфических 3'-праймеров к генам *apoA-I*, *ABCA1* и *GRP78*. Для проведения реакции использовались реактивы компании «Promega», США.

ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) проводили по технологии Taqman или по интеркаляции SYBR Green с использованием амплификатора CFX-96 («Bio-Rad»). Компоненты реакционной смеси были приобретены у компании «Синтол», Россия. Праймеры и флуоресцентные пробы для *apoA-I*, *ABCA1* и референсных генов, кодирующих белки RPLP0, циклофиллин А и β-актин, были описаны ранее [44, 10, 22, 28]. Для детекции мРНК гена *GRP78* использовали следующие праймеры и зонд: прямой праймер – 5'-GTTCTTGCCGTTCAAGGTG-3'; обратный праймер – 5'-TTTCCCAAATAAGCCTCA-GC-3'; зонд – 5'-Cy5.5-TGCTCCTGAAGAAATTTCTGCCATGG-RTQ2-3'. Подбор праймеров и зонда проводили с помощью программы Primer3 (<https://primer3.org/>). Относительные уровни мРНК гена *apoA-I* оценивали путём детекции референсных генов в той же реакции (multiplex PCR). Нормализацию результатов проводили по геометрическому среднему из трёх референсных генов, как описано ранее [45]. Число циклов PCR для каждого гена, при котором уровень флуоресценции превышал в 10 раз значения стандартного отклонения флуктуаций в фоновой флуоресценции, определяли с помощью CFX-96 RealTime PCR System («Bio-Rad»). Относительные значения уровня мРНК *apoA-I* (в процентах относительно контрольного образца) определяли по формуле:

$$2^{(Ct(\text{control}) - Ct(\text{опыт}))} * 100.$$

**Вестерн-блоттинг.** Клетки лизировали в буфере RIPA-50 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1% SDS, 0,01% NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF, pH 7,4). Белки разделяли диск-электрофорезом в 12%-ном денатурирующем полиакриламидном геле, переносили с помощью электроблоттинга на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C с размером пор 0,45 мкм («Amersham», Великобритания). После переноса мембрану блокировали в 5%-ном обезжиренном молоке, приготовленном на PBS с добавлением 0,02% (v/v) Tween 20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с мышиными моноклональными антителами против ApoA-I человека в течение 12 ч при 4 °C, трижды отмывали в PBS с добавлением 0,02% (v/v) Tween 20, инкубировали со вторичными антителами против иммуноглобули-

нов мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммунореактивные полосы выявляли с помощью усиленной хемотролюминесценции (ECL) на Chemidoc XRS+ System («Bio-Rad»). Оцифровку полученных изображений проводили с помощью денситометрии в программе ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

**Проточная цитофлуориметрия.** Клетки фиксировали в 4%-ном формальдегиде в течение 10 мин при 22 °C, отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,1 M глицина, и инкубировали 40 мин при 22 °C в блокирующем буфере (PBS, содержащий 1% BSA, 3% FCS, неспецифические человеческие IgG (1 мкг/мл) и 0,02% (v/v) Tween 20). Клетки инкубировали с мышиными моноклональными антителами против человеческого ApoA-I (разведение 1/250) в PBS, содержащем 1% BSA и 0,02% (v/v) Tween 20, в течение 2 ч при 22 °C, отмывали 3 раза PBS и инкубировали со вторичными кроличьими антителами F(ab')<sub>2</sub> против IgG мыши, мечеными флуорофором Alexa 647 (разведение 1/1000) в PBS, содержащем 1% BSA и 0,02% (v/v) Tween 20, в течение 1 ч при 22 °C. Затем клетки отмывали 3 раза в PBS и фиксировали в PBS, содержащем 1% формальдегид, для проточной цитофлуориметрии. Клетки, обработанные вторичными антителами, но не инкубированные с антителами против ApoA-I, использовали в качестве контроля специфичности иммунной окраски (изотип-контроль). Проточная цитофлуориметрия и клеточный сортинг были проведены, используя Epics Altra flow cytometer («Beckman Coulter») и программу FCSalyzer (<https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>).

**Статистическая обработка.** Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента (непарный *t*-тест). Множественные сравнения проводили с помощью критерия Даннета. Различия считались статистически значимыми при *p* < 0,05. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Инкубация макрофагов с оксЛПНП стимулирует экспрессию гена *apoA-I* через 24 ч и подавляет через 48 и 72 ч.** Центральным процессом при образовании атеросклеротической бляшки является усиленный захват макрофагами модифи-

цированных ЛПНП, сопровождающийся образованием так называемых пенистых клеток [1, 32, 33]. Представлялось интересным исследовать изменение динамики экспрессии гена *apoA-I* при формировании пенистых клеток. Образование пенистых клеток в результате захвата оксЛПНП макрофагами ТНР-1 контролировали окраской клеток липидофильным красителем Oil Red O и гематоксилином (рис. 1). Инкубация макрофагов с оксЛПНП (50 мкг/мл) в течение 24 и 48 ч приводила к последовательному накоплению в цитоплазме липидных вакуолей, характерных для пенистых клеток. Вместе с тем использованные концентрации оксЛПНП и сроки инкубации не приводили к окончательному заполнению цитоплазмы макрофагов липидными вакуолями и к некротическому распаду, характерному для поздних стадий формирования пенистых клеток (рис. 1).

оксЛПНП являются источником окисленных форм холестерина, природных лигандов ядерных рецепторов LXR. В предыдущих исследованиях мы показали, что активация рецепторов LXR в моноцитах и макрофагах сопровождается усилением экспрессии гена *apoA-I*. Учитывая вышесказанное, ожидалось, что захват макрофагами оксЛПНП будет сопровождаться активацией экспрессии *apoA-I* за счёт накопления в клетке лигандов LXR. Для проверки данного предположения макрофаги линии ТНР-1 (рис. 2, а) или первичные макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека (рис. 2, б), инкубировали с оксЛПНП (50 мкг/мл) в течение 24, 48 и 96 ч. Для сравнения клетки в течение тех же сроков инкубировали с синтетическим агонистом рецепторов LXR. Методом qRT-PCR установлено, что хотя через 24 ч инкубации с оксЛПНП наблюдается индукция экспрессии гена *apoA-I*

сравнимая с индукцией, вызванной лигандами LXR, уже через 48 ч инкубации с оксЛПНП происходит подавление синтеза мРНК *ApoA-I*. Через 96 ч инкубации репрессорный эффект усиливается. При этом действие агониста LXR прогрессивно нарастает в течение всего времени инкубации.

Препараты оксЛПНП, полученные из плазмы крови человека, могут содержать примеси экзогенного *ApoA-I* человека. Учитывая относительно низкий уровень синтеза *ApoA-I* в макрофагах, примеси экзогенного *ApoA-I* могут серьёзно исказить результаты анализа уровня белка *ApoA-I* при инкубации макрофагов с оксЛПНП. Для предотвращения подобной контаминации можно использовать препараты ЛПНП, выделенные из сыворотки крупного рогатого скота [10]. С другой стороны, нельзя исключить видоспецифическое действие оксЛПНП на макрофаги. Для проверки возможных видоспецифических эффектов оксЛПНП были поставлены параллельные эксперименты по инкубации макрофагов ТНР-1 и макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека, с человеческими оксЛПНП и оксЛПНП крупного рогатого скота (рис. 2, а и б). Существенных отличий в действии оксЛПНП человека и оксЛПНП крупного рогатого скота на уровень мРНК *ApoA-I* не выявлено на всех сроках инкубации. Дальнейшие эксперименты проводили с оксЛПНП крупного рогатого скота. На рис. 2, в представлены данные экспериментов по изучению дозозависимости эффектов оксЛПНП на уровень мРНК *ApoA-I*. Установлено, что стимулирующее действие оксЛПНП начинается с концентрации 15 мкг/мл, а угнетающее — с 25 мкг/мл с последующим дозозависимым нарастанием обоих эффектов. Стимуляция экспрессии ге-

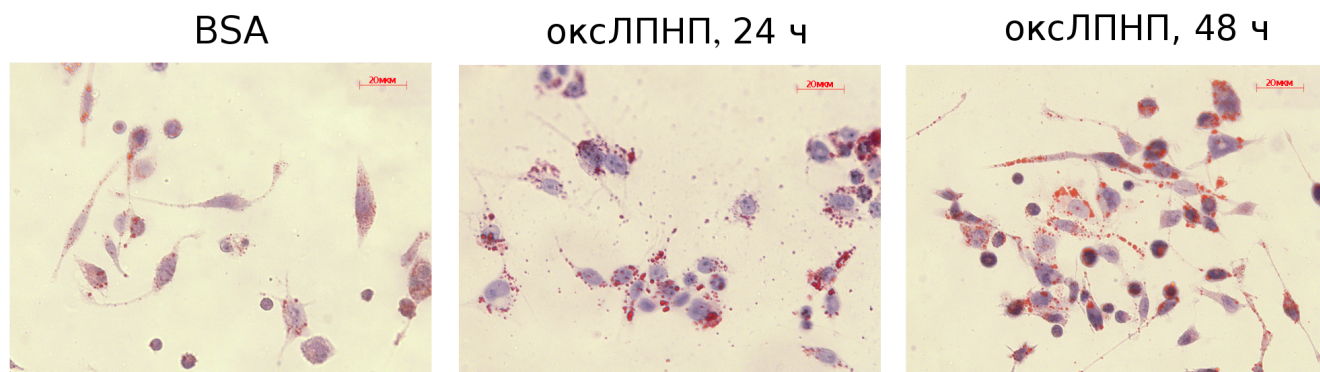


**Рис. 1.** Формирование пенистых клеток при инкубации макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП в течение 24 и 48 ч. После инкубации с оксЛПНП человека (50 мкг/мл) макрофаги ТНР-1 окрашивали Oil Red O и гематоксилином, как описано в «Материалах и Методах», и выявляли липидные вакуоли световой микроскопией (окрашены красным). BSA — контрольные клетки, инкубированные с бычьим сывороточным альбумином (50 мкг/мл)

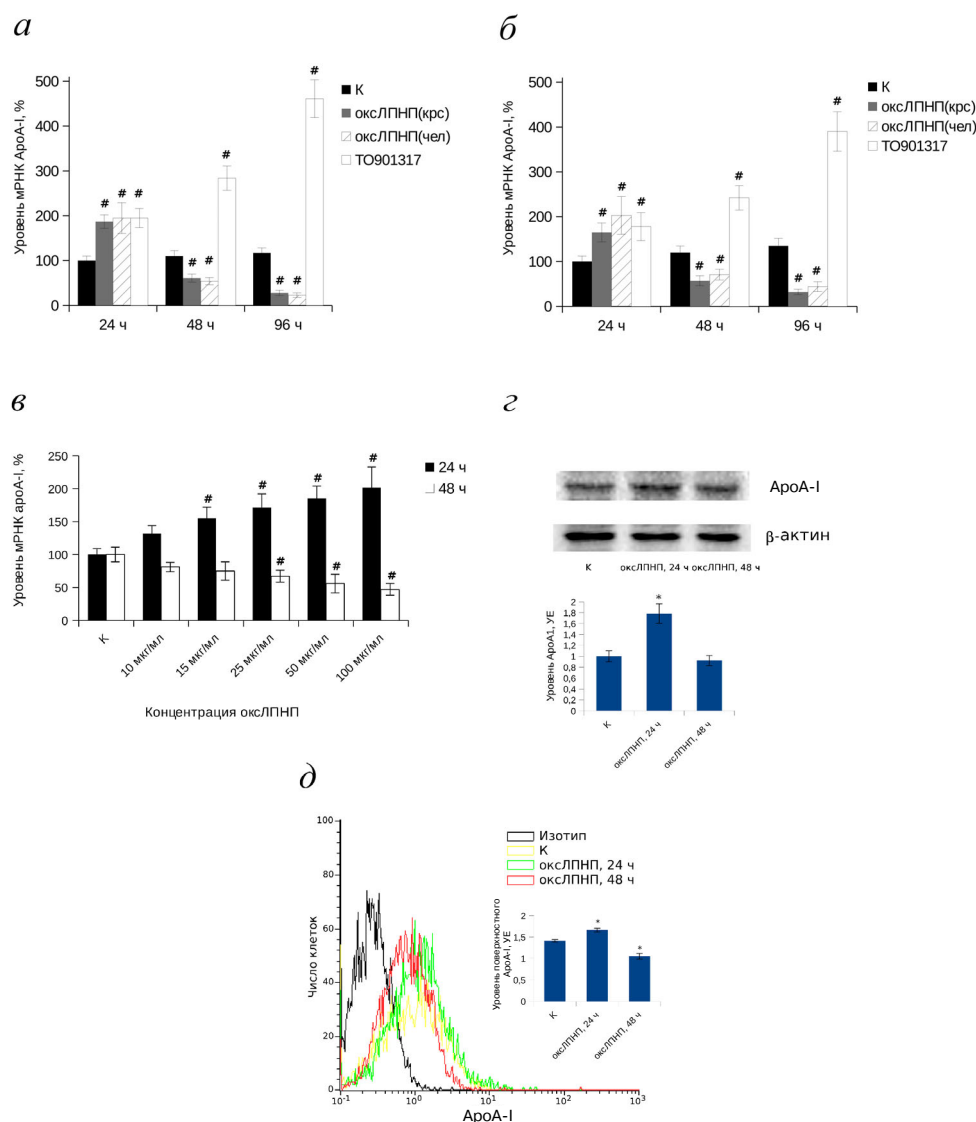


**Рис. 2.** Зависимость уровня экспрессии *apoA-I* в макрофагах ТНР-1 (**а, в–д**) или в первичных макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека (**б**), от времени инкубации макрофагов с оксЛПНП (50 мкг/мл): **а, в–д** – клетки ТНР-1 дифференцировали индукцией РМА как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли оксЛПНП, выделенные из плазмы крови человека (оксЛПНП(чел)), либо оксЛПНП, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота (оксЛПНП(крс)), до концентрации 50 мкг/мл, либо агонист LXR (TO901317) (5 мкМ) и инкубировали указанное время; **б** – моноциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров, дифференцировали 4 дня, далее добавляли оксЛПНП, выделенные из плазмы крови человека (оксЛПНП(чел)), либо оксЛПНП, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота (оксЛПНП(крс)), до концентрации 50 мкг/мл, либо агонист LXR (TO901317) (5 мкМ) и инкубировали указанное время. **в** – Зависимость действия оксЛПНП на уровень мРНК ApoA-I при инкубации в течение 24 и 48 ч от концентрации оксЛПНП. **а–в** – Из клеток выделяли РНК и проводили определение уровня мРНК ApoA-I методом qRT-PCR. Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*, *β-актин* и *rplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий опытных групп с контрольными проверялась с использованием *t*-критерия Стьюдента, # соответствуют  $p < 0,05$ . **г** – Анализ уровня клеточного ApoA-I в макрофагах ТНР-1 после инкубации с оксЛПНП (50 мкг/мл) в течение 24 или 48 ч методом Вестерн-блота. Диаграмма содержит данные, полученные в ходе оцифровки трёх иммуноблотов с помощью денситометрии. Значения по оси Y соответствуют относительному уровню белка ApoA-I (1 условная единица (УЕ) в необработанных клетках). Проведена нормализация значений по уровню β-актина. **д** – Результаты проточной цитофлуориметрии. К макрофагам ТНР-1 добавляли оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 24 или 48 ч. Клетки фиксировали и обрабатывали антителами против ApoA-I человека. В качестве вторичных антител использовали антимышьи антитела (Fab')<sub>2</sub>, меченые Alexa 647. Изотип-контроль представлен клетками, обработанными только вторичными флуоресцентно меченными антителами. В контрольные образцы, не содержащие оксЛПНП, добавляли BSA в концентрации 50 мкг/мл. На диаграмме представлены средние значения (X-mean) интенсивности флуоресценции, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Достоверность различий проверяли с использованием *t*-критерия Стьюдента, \* соответствует  $p < 0,05$

на *aroA-I* через 24 ч после инкубации макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП сопровождается также повышением в клетках уровня белка АроА-I (рис. 2, з). Интересно, что через 48 ч инкубации с оксЛПНП, в отличие от мРНК АроА-I, чьё количество падает относительно контрольного, уровень клеточного АроА-I возвращается к значению, характерному для нестимулированных клеток (рис. 2, з). В предыдущих исследованиях, посвящённых выяснению функций АроА-I в макрофагах, было установлено, что существенную роль играет не столько общее содержание АроА-I в клетках, сколько уровень поверхностного АроА-I, связанного с наружной поверхностью плазматической мембраны [10]. В связи с этим представлялось интересным оценить влияние оксЛПНП на поверхностный АроА-I. Результаты представлены на рис. 2, д. Установлено, что после инкубации макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП в течение 24 ч наблюдается повышение уровня поверхностного АроА-I. Через 48 ч инкубации уровень поверхностного АроА-I падает ниже значений, характерных для нестимулированных клеток. Полученные результаты указывают на то, что, хотя на ранних стадиях образования пенистых клеток оксЛПНП действительно стимулируют экспрессию *aroA-I*, возможно, через накопление в клетках лигандов LXR, уже на вторые сутки после начала эксперимента происходит обращение эффекта.

**Подавление экспрессии гена *aroA-I* при длительной инкубации макрофагов с оксЛПНП не связано с развитием стресса ЭПР или накоплением в клетках липидов.** Подавление экспрессии гена *aroA-I* может быть обусловлено тремя механизмами. Во-первых, формирование пенистых клеток может быть сопряжено с развитием стресса эндоплазматического ретикулума [46, 47] и приводить к репрессии генов секреторных белков, содержащих сигнальные пептиды и транслирующихся в просвет ЭПР. Развитие стресса ЭПР в макрофагах после инкубации в течение 48 ч с оксЛПНП оценивали, измеряя уровень экспрессии гена *GRP78* — одного из шаперонов ЭПР, чья экспрессия резко возрастает при стрессе ЭПР. В качестве положительного контроля стресса ЭПР использовали стимуляцию макрофагов ТНР-1 туникамицином — веществом, блокирующим N-гликозилирование белков в ЭПР, что приводит к стрессу (рис. 3, а). Установлено, что в наших условиях эксперимента стресс ЭПР не развивался, так как инкубация макрофагов с оксЛПНП не приводила к индукции экспрессии *GRP78*.

Во-вторых, на экспрессию гена *aroA-I* может влиять накопление в клетках продуктов ме-

таболизма оксЛПНП, часть из которых могут выполнять функции лигандов ядерных рецепторов, способных связываться с 5'-регуляторной областью гена *aroA-I* и регулировать его экспрессию, таких как PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ . Если гипотезу о роли LXR в оксЛПНП-опосредованном подавлении синтеза АроА-I можно отвергнуть на основании данных, представленных на рис. 2, то вопрос об участии других ядерных рецепторов остается открытым. В-третьих, оксЛПНП могут выполнять сигнальные функции. В литературе имеются данные о способности оксЛПНП взаимодействовать с рецептором TLR4, что приводит к активации в клетке ряда воспалительных сигнальных каскадов [48]. Кроме того, интернализация оксЛПНП такими скевенджер-рецепторами, как CD36 и LOX1, также сопровождается инициацией ряда сигнальных каскадов в макрофагах [49, 50]. Для проверки участия второго механизма в подавлении синтеза АроА-I при продолжительной инкубации оксЛПНП с макрофагами мы провели сортировку макрофагов ТНР-1 методом проточной цитофлуорометрии после 48 ч инкубации с флуоресцентно меченными оксЛПНП. В данных условиях эксперимента только ~65% макрофагов приобретают фенотип пенистых клеток (рис. 3, б). Из макрофагов ЛПНП+ и ЛПНП– выделяли РНК, и методом qRT-PCR оценивали уровень мРНК гена *aroA-I* в сравнении с клетками, не инкубированными с оксЛПНП (рис. 3, в). Контроль эффективности сортировки проводили, оценивая уровень экспрессии гена *ABCA1* (рис. 3, з), для которого известна положительная связь уровня транскрипции с захватом оксЛПНП [51]. Установлено, что уровень мРНК *ABCA1* в клетках ЛПНП– не отличался от контрольного уровня. Вместе с тем в клетках ЛПНП+, в соответствии с литературными данными, наблюдалась существенная индукция синтеза мРНК *ABCA1*. Полученные результаты подтверждают эффективность выбранного методического подхода. В тех же условиях эксперимента уровень мРНК АроА-I был одинаков в клетках ЛПНП– и ЛПНП+ и составлял ~50% от контрольного уровня. Следовательно, подавление экспрессии гена *aroA-I* при длительной инкубации оксЛПНП с макрофагами не связано с накоплением в макрофагах липидных компонентов. Полученные результаты поддерживают сигнальный механизм подавления экспрессии гена *aroA-I* при продолжительной инкубации макрофагов с оксЛПНП.

**Роль рецептора TLR4 в регуляции экспрессии гена *aroA-I* в макрофагах при инкубации с оксЛПНП.** Наиболее вероятным кандидатом на

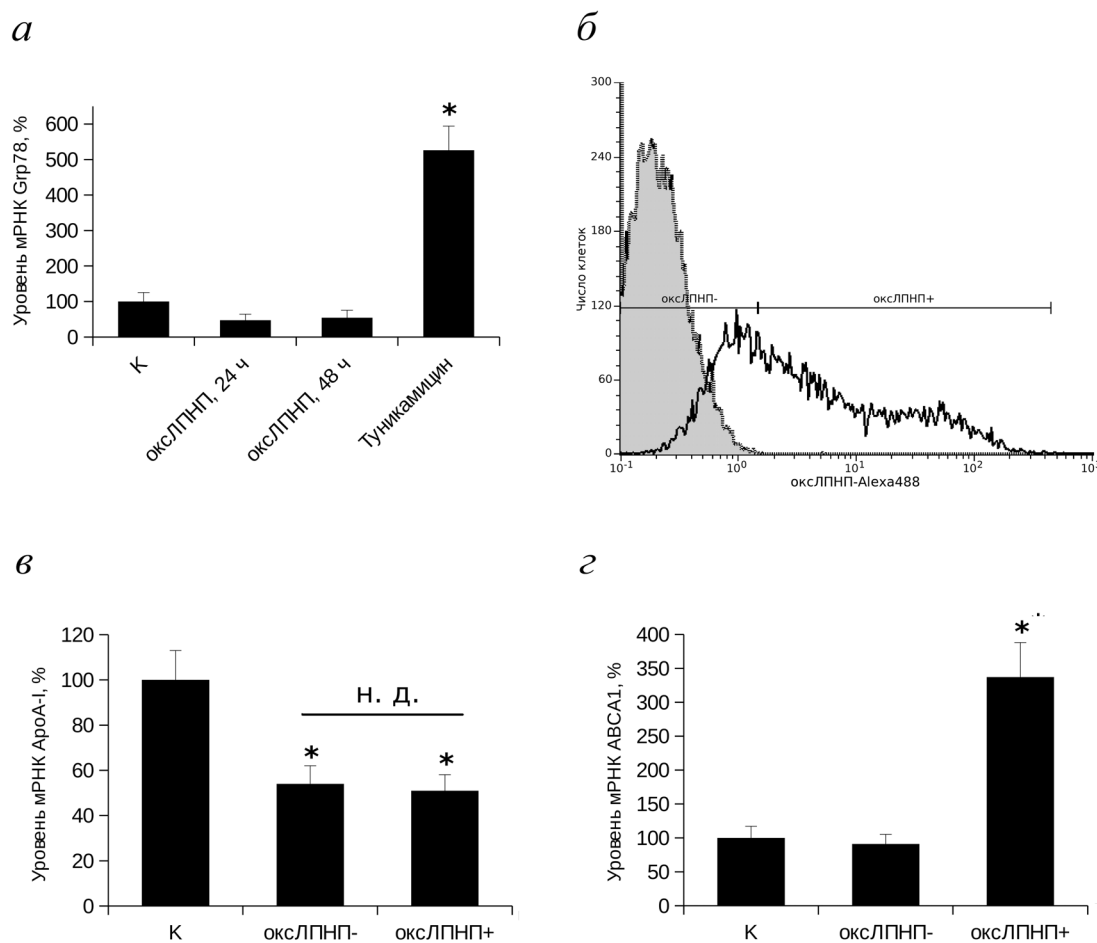


**Рис. 3.** Влияние захвата макрофагами оксЛПНП на уровень экспрессии гена *apoA-I*: *а* — инкубация макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП не приводит к стрессу ЭПР. Клетки ТНР-1 дифференцировали индукцией РМА как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали в течение 24 или 48 ч либо добавляли туникамицин (1 мкг/мл) с последующей инкубацией 24 ч. К контрольным образцам добавляли BSA до концентрации 50 мкг/мл. Из клеток выделяли РНК и проводили определение уровня мРНК *Grp78* методом qRT-PCR. *б-г* — Зависимость экспрессии генов *apoA-I* и *ABCA1* от захвата макрофагами ТНР-1 оксЛПНП. Клетки ТНР-1 дифференцировали индукцией РМА как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли флуоресцентно меченные (Alexa 488) оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали в течение 48 ч. *б* — Анализ захвата макрофагами ТНР-1 меченых оксЛПНП с последующей сортировкой методом проточной цитофлуорометрии. Точечной линией с серой заливкой показано распределение флуоресценции клеток, инкубированных с BSA (отрицательный контроль), черной сплошной линией — распределение флуоресценции клеток после инкубации с оксЛПНП-Alexa 488. Показаны гейты (оксЛПНП- и оксЛПНП+), использованные при сортировке клеток по уровню захвата меченых оксЛПНП. Из отсортированных клеток выделяли РНК и проводили анализ экспрессии генов *apoA-I* (*в*) и *ABCA1* (*г*) методом qRT-PCR. оксЛПНП- соответствует РНК, выделенной из клеток, не поглотивших значительные количества оксЛПНП (гейт оксЛПНП-), оксЛПНП+ соответствует РНК, выделенной из нагруженных оксЛПНП макрофагов (гейт оксЛПНП+). Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*,  $\beta$ -актин и *gplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий между необработанными клетками (К) и макрофагами, инкубированными с оксЛПНП, проверялась с использованием *t*-критерия Стьюдента, \* соответствуют  $p < 0,05$ ; н.д. — отсутствие статистически достоверных различий между макрофагами, захватившими (оксЛПНП+) и не захватившими (оксЛПНП-) значительные количества оксЛПНП

роль сигнального рецептора оксЛПНП является белок TLR4, чей основной лиганд — LPS. При этом взаимодействие оксЛПНП с этим рецептором также приводит к активации соответствующих провоспалительных сигнальных каскадов. Для проверки возможной роли TLR4 в регуляции экспрессии гена *apoA-I* под действи-

ем ЛПНП использовали блокирующие антитела к рецептору TLR4. Результаты представлены на рис. 4. При инкубации в течение 24 ч блокирование рецептора TLR4 приводило к инвертированию стимулирующего эффекта оксЛПНП (рис. 4, *а*). Исследование роли рецептора TLR4 в подавлении активности гена *apoA-I* при инку-

бации макрофагов с оксЛПНП в течение 48 ч показало, что предварительная инкубация макрофагов с блокирующими антителами к рецептору TLR4 приводила к полной отмене эффекта оксЛПНП, но не к отмене эффекта лиганда LXR (рис. 4, б). Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что как стимулирующий (инкубация 24 ч), так и подавляющий (инкубация 48 ч) эффекты оксЛПНП на уровень мРНК АроА-1 в макрофагах обусловлены взаимодействием оксЛПНП с рецептором TLR4 и активацией соответствующих сигнальных каскадов.

**Роль сигнальных каскадов MAP-киназ и фактора транскрипции NF-κB в TLR4-опосредованной регуляции гена *aroA-I*.** Известно, что активация TLR4 запускает в макрофагах ряд сигнальных каскадов: основные MAP-киназные каскады (p38, ERK1/2, JNK1/2/3) и каскад, ведущий к индукции провоспалительного фактора транскрипции NF-κB [52]. Изучение роли провоспалительных каскадов проводили на 48-часовой модели макрофагов THP-1, инкубированных с оксЛПНП, для того чтобы исключить возможную интерференцию с дополнительными сигнальными цепочками, действующими независимо от рецептора TLR4. Для проверки возможной роли этих каскадов в подавлении гена *aroA-I* при инкубации макрофагов с оксЛПНП в течение 48 ч были использованы ингибиторы соответствующих сигнальных путей. На рис. 5 представлены результаты соответствующих экспериментов. Установлено, что

блокирование сигнальных каскадов NF-κB, JNK и ERK1/2 приводит к угнетению экспрессии гена *aroA-I* в макрофагах THP-1, что свидетельствует о важности соответствующих сигнальных путей в регуляции активности данного гена. На этом фоне инкубация макрофагов с оксЛПНП не приводила к дальнейшему снижению уровня мРНК АроА-1 в клетках. Следовательно, оксЛПНП-зависимое угнетение синтеза АроА-1 в макрофагах реализуется с участием MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK (но не p38), а также фактора транскрипции NF-κB (в противном случае, если бы оксЛПНП действовали независимо от данных сигнальных цепочек, подавляющие действия ингибиторов и оксЛПНП на уровень мРНК АроА-1 суммировались бы, что противоречит результатам эксперимента). Таким образом, можно утверждать, что за подавление экспрессии гена *aroA-I* при 48-часовой инкубации с оксЛПНП отвечает TLR4-зависимая активация NF-κB, JNK и ERK1/2, но не p38.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вопросы о функциях эндогенного АроА-1 в макрофагах, детали регуляции экспрессии этого гена, возможное участие эндогенного АроА-1 в процессах атерогенеза до сих пор во многом остаются открытыми. Показанная нами ранее противовоспалительная активность АроА-1 в макрофагах, его способность стабилизировать кас-

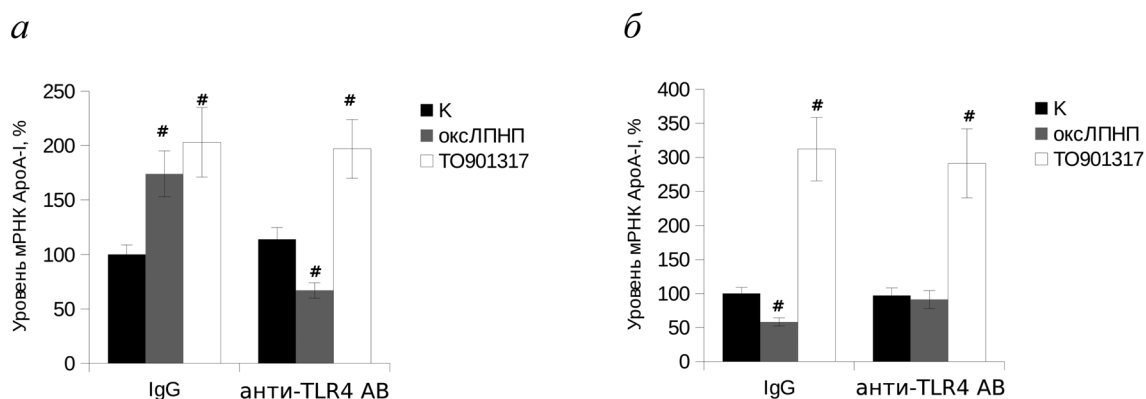


**Рис. 4.** Роль рецептора TLR4 в регуляции экспрессии гена *aroA-I* при инкубации макрофагов человека с оксЛПНП в течение 24 (а) и 48 (б) часов. Клетки THP-1 дифференцировали индукцией PMA как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли блокирующие антитела против TLR4 человека (анти-TLR4 AB) в концентрации 5 мкг/мл. В контрольные образцы добавляли неспецифические IgG человека в той же концентрации. Через 15 мин инкубации с антителами к клеткам добавляли оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл либо агонист LXR TO901317 (5 мкМ) и инкубировали в течение 24 или 48 ч. В контрольные точки вносили BSA (50 мкг/мл). Из клеток выделяли РНК и проводили определение уровня мРНК АроА-1 методом qRT-PCR. Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*, *β-актин* и *rplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий обработанных оксЛПНП или TO901317 макрофагов с контрольными необработанными клетками проверялась по критерию Даннета, # соответствуют  $p < 0,05$

сетный транспортёр ABCA1 [10], а также ряд данных по влиянию экспрессии экзогенного гена *apoA-I* человека в макрофагах мыши на развитие атеросклеротических повреждений [13–16] позволяют уверенно говорить об антиатерогенном действии ApoA-I в макрофагах. В настоящей работе впервые изучена динамика экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека в процессе захвата ими оксЛПНП — процессе, приводящем к формированию пенистых клеток. Накопление липидов и, в частности, холестерина в макрофагах приводит к активации генов белков, участвующих в обратном транспорте холестерина, таких как кассетные транспортеры ABCA1 и ABCG1. Ключевую роль в этом процессе играют ядерные рецепторы PPAR $\gamma$  и LXR, чьи агонисты накапливаются в клетке при поглощении оксЛПНП [51]. Гены *ABCA1* и *ABCG1* являются прямыми мишенями факторов транскрипции LXR (регуляторные районы *ABCA1* и *ABCG1* содержат сайты связывания LXR), а ген *LXR $\beta$*  активируется рецептором PPAR $\gamma$  [51]. Регуляторная область гена *apoA-I* человека также содержит сайт связывания для ядерных рецепторов LXR (сайт С в составе гепатоцитарного энхансера) [20]. Более того, в гепатоцитах факторы транскрипции LXR взаимодействуют с этим сайтом и подавляют активность гена *apoA-I* [20, 32]. Ранее мы показали, что в макрофагах LXR сохраняют способность взаимодействовать с сайтом С гепатоцитарного энхансера гена *apoA-I*, но в отличие от гепатоцитов в макрофагах LXR являются активаторами экспрессии гена *apoA-I* [11]. Таким образом, можно было ожидать, что захват макрофагами оксЛПНП будет сопровождаться не только индукцией экспрессии генов кассетных транспортеров ABCA1 и ABCG1, но и активацией гена *apoA-I* по сходному, LXR-зависимому механизму. Проведенная в рамках этой статьи проверка данного предположения выявила гораздо более сложные механизмы изменения активности гена *apoA-I* при захвате макрофагами оксЛПНП. Хотя инкубация макрофагов с оксЛПНП в течение 24 ч действительно приводила к усилению экспрессии гена *apoA-I* как на уровне мРНК, так и на уровне белка, данный процесс не зависел от накопления в клетках лигандов для ядерных рецепторов LXR. Вывод о независимости усиления экспрессии *apoA-I* от накопления в клетках лигандов ядерных рецепторов LXR поддерживается результатами эксперимента, представленными на рис. 4, а — блокирование рецептора TLR4 приводит к инверсии действия оксЛПНП на ген *apoA-I*. В макрофагах LXR являются активаторами гена *apoA-I* (см. эффект агониста LXR TO901317, рис. 2,

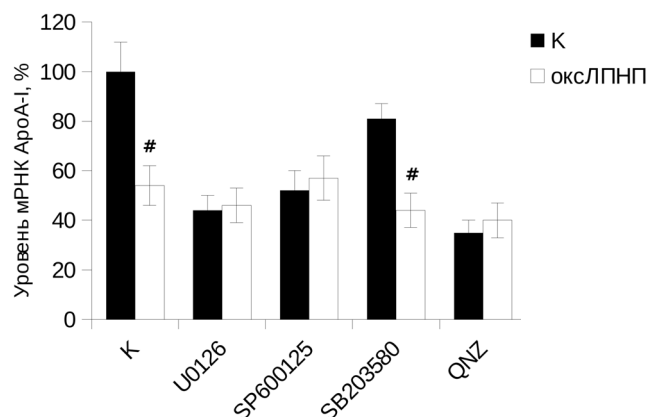


**Рис. 5.** Роль сигнальных каскадов рецептора TLR4 в подавлении экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах при инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч: клетки THP-1 дифференцировали индукцией PMA как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли ингибитор p38-MAPK SB203580 (25 мкМ), ингибитор JNK1/2/3 SP600125 (10 мкМ), ингибитор MEK1/2 U0126 (10 мкМ) и ингибитор NF- $\kappa$ B QNZ (10 нМ). Инкубацию проводили в течение 1 ч. Далее добавляли оксЛПНП (50 мкг/мл) или BSA (50 мкг/мл, контроль) и инкубировали в течение 48 ч. Анализ экспрессии *apoA-I* проводили методом qRT-PCR. Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (циклофилин A,  $\beta$ -актин и *rplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическую достоверность различий между инкубированными и неинкубированными с оксЛПНП макрофагами проверяли по критерию Даннета, # соответствуют  $p < 0,05$

а и б), следовательно, если бы усиление экспрессии после 24-часовой инкубации с оксЛПНП было действительно вызвано накоплением в клетке лигандов LXR, то можно было бы ожидать, что блокирование TLR4 либо вообще не окажет влияния на действие оксЛПНП, либо приведёт к ослаблению стимулирующего действия. В реальности блокирование рецептора TLR4 приводило к инвертированию эффекта оксЛПНП на уровень мРНК ApoA-I — в таких условиях наблюдалось подавление экспрессии гена *apoA-I* уже через 24 ч после инкубации макрофагов с оксЛПНП. Полученные результаты можно объяснить разнонаправленным характером воздействия оксЛПНП на активность гена *apoA-I*. Наряду со стимулирующим действием через рецептор TLR4, индуцируются дополнительные сигнальные пути, негативно регулирующие ген *apoA-I*. Эффект от активации рецептора TLR4 оказывается более выраженным, поэтому негативная регуляция выявляется только при блокировании TLR4. Сигнальные цепочки, которые лежат в основе этой негативной регуляции, остаются неизвестными, для их выявления требуется проведение до-

полнительных исследований. В литературе имеются противоречивые данные о способности оксЛПНП инициировать сигнальные каскады через взаимодействие с рецептором TLR4 (см. раздел «Введение»). В частности, в ряде работ утверждается, что регистрируемая активация сигнальных путей обусловлена при-месью эндотоксина в препаратах оксЛПНП, который, связываясь с TLR4, ответственно за наблюдаемые эффекты [37, 38]. Для исключения возможной активации рецептора TLR4 примесным эндотоксином в наших экспериментах ко всем экспериментальным точкам добавляли полимиксин В — вещество, связывающее и инактивирующее эндотоксин. Таким образом, совокупность представленных данных позволяет сделать вывод, что усиление синтеза АроА-I в макрофагах человека в результате 24-часовой инкубации макрофагов с оксЛПНП обусловлено инициацией в клетках сигнальных каскадов при взаимодействии оксЛПНП с TLR4.

Изучение долговременных эффектов оксЛПНП на активность гена *aroA-I* также привело к неожиданным результатам. В отличие от лиганда LXR, стимулирующее действие которого на активность гена *aroA-I* только усиливалось с течением времени, оксЛПНП, начиная с 48 ч инкубации, прогрессивно подавляли активность данного гена. Возможным объяснением подобной инверсии могло бы быть развитие в макрофагах стресса ЭПР, описанное ранее при захвате макрофагами оксЛПНП [46, 47]. Тем не менее в наших экспериментах стресс ЭПР зафиксирован не был. Причинами подобных расхождений, возможно, являются недостаточные сроки инкубации и концентрации оксЛПНП. Косвенным подтверждением данного предположения является низкий уровень апоптоза (менее 10%) среди макрофагов, культивировавшихся в присутствии оксЛПНП, что свидетельствует о начальных стадиях формирования пенистых клеток, достигнутых в наших экспериментах, при которых стресс ЭПР ещё не развивается (данные не приведены).

Подавляющее действие оксЛПНП при длительных сроках инкубации на активность гена *aroA-I* нельзя также объяснить накоплением в клетках липидов и их производных. Эксперименты по сортировке макрофагов после инкубации с флуоресцентно мечеными оксЛПНП показали, что в отличие от гена *ABCA1*, чья индукция наблюдалась исключительно в клетках, захвативших значительные количества оксЛПНП, экспрессия гена *aroA-I* оказалась одинаково снижена как в липид-нагруженных, так и в липид-ненагруженных макрофагах. Полученные

результаты однозначно свидетельствуют в пользу сигнального механизма действия оксЛПНП. Эксперименты по блокировке рецептора TLR4 окончательно подтвердили данное предположение. В этих условиях подавляющее действие оксЛПНП не проявлялось. Следовательно, за подавление активности гена *aroA-I* при длительной инкубации макрофагов с оксЛПНП ответственные сигнальные каскады, инициируемые на рецепторе TLR4. Интересным фактом в данном случае является то, что стимуляция одного и того же рецептора одним и тем же лигандом в зависимости от сроков инкубации оказывает диаметрально противоположное действие на экспрессию гена-мишени. Подобный эффект при активации рецептора TLR4 на экспрессию генов в макрофагах уже описывали ранее. Экспрессия генов, например *Cttnb1*, *Maff*, *Zfp361l*, *Dnaja4*, *MOUSE UPF04* и *Slbp*, при связывании с LPS рецептора TLR4 возрастала в первые 2–4 ч, но далее подавлялась в течение 8 ч [53]. Ингибиторный анализ позволил выявить важную роль MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK, а также фактора транскрипции NF-κB в подавлении гена *aroA-I* при длительной инкубации макрофагов с оксЛПНП. Ранее было показано, что данные MAP-киназные каскады участвуют в активации гена *aroA-I* в макрофагах человека под действием TNFα [11], а также в условиях гипоксии [12], причём в этом процессе важную роль играют факторы транскрипции LXR. В случае репрессорного действия оксЛПНП участие LXR представляется маловероятным, возможно, в данном процессе задействованы такие факторы транскрипции, как FOXO1–3, взаимодействующие с сайтом В гепатоцитарного энхансера гена *aroA-I* [27, 28]. Интересно, что эффекты ингибиторов MAP-киназ и NF-κB на уровень активности гена *aroA-I* в макрофагах человека зависят, по-видимому, от степени дифференцировки макрофагов. В моноцитах блокирование любого из трёх основных MAP-киназных каскадов, а также блокирование фактора транскрипции NF-κB приводит к повышению уровня мРНК АроА-I [11]. По мере дифференцировки стимулирующие эффекты ингибиторов ослабевают и меняются на противоположные [11, 12]. Учитывая индивидуальность скорости дифференцировки моноцитов в макрофаги в каждом эксперименте, общее нарастание уровня мРНК АроА-I в макрофагах по мере дифференцировки [10], а также разделение в ходе дифференцировки макрофагов на АроА-I-бедные и АроА-I-богатые [10, 11], сравнивать между собой данные по влиянию ингибиторов на базовый уровень мРНК АроА-I, полученные в раз-

ных экспериментах, довольно затруднительно. Тем не менее данное обстоятельство не является препятствием для применения ингибиторного анализа с целью выяснения роли сигнальных каскадов в действиях каких-либо внешних стимулов на уровень активности гена *apoA-I* в макрофагах человека. Ещё одним потенциальным подводным камнем при интерпретации результатов ингибиторного анализа может быть неспецифическая активность использованных ингибиторов. Так, например, имеются данные о способности использованного нами ингибитора киназ семейства p38, SB203580, угнетать в высоких концентрациях также киназы JNK [54]. Хотя наши результаты свидетельствуют об отсутствии подобного перекрестного действия (в противном случае обработка клеток SB203580 приводила бы к такому же эффекту, как и применение специфического ингибитора киназ JNK SP600125, что не соответствует полученным результатам), нельзя исключить влияния использованных в работе ингибиторов на какие-то другие сигнальные пути в клетках. Исходя из вышесказанного, представленные в настоящей работе данные о роли MAP-киназных каскадов в оксЛПНП-опосредованном подавлении экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека следует рассматривать как предварительные, окончательные доказательства требуют проведения дополнительных экспериментов, например, с использованием РНК-интерференции.

Регуляторные районы гена *apoA-I* человека не содержат сайт связывания для фактора транскрипции NF-κB. Тем не менее данный фактор транскрипции принимает участие в LPS- и TNFα-опосредованном подавлении экспрессии гена *apoA-I* в гепатоцитах [55, 43], а также в индукции экспрессии *apoA-I* в макрофагах под действием TNFα [11] и в условиях гипоксии [12]. Эффекты NF-κB обусловлены его взаимодей-

ствием с позитивным регулятором экспрессии гена *apoA-I* в печени — ядерным рецептором PPARα. Такое взаимодействие приводит к взаимному ингибированию обоих факторов транскрипции (механизм транс-репрессии) [55]. Интересно, что в макрофагах человека PPARα также регулирует экспрессию *apoA-I*, но в отличие от гепатоцитов действует в качестве репрессора транскрипции [11]. Возможно, что механизмы действия NF-κB на уровень экспрессии *apoA-I* в макрофагах и гепатоцитах сходны, данный вопрос требует проведения дополнительных исследований.

Суммируя, в настоящей работе впервые показаны изменения экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека при начальных этапах формирования пенистых клеток. Выявлена сложная, имеющая разнонаправленный характер динамика экспрессии, в частности, показано, что исходная индукция синтеза ApoA-I в течение первых суток через 48 ч сменяется подавлением экспрессии гена *apoA-I*. При этом как стимуляция, так и подавление экспрессии *apoA-I* не связаны с накоплением в макрофагах липидов, а обусловлены взаимодействием оксЛПНП с рецептором TLR4.

**Финансирование.** Данная работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 17-15-01326).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolf, D., and Ley, K. (2019) Immunity and Inflammation in Atherosclerosis, *Circ. Res.*, **124**, 315-327, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
2. Zannis, V. I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *J. Mol. Med.*, **84**, 276-294, doi: 10.1007/s00109-005-0030-4.
3. Никифорова А. А., Хейфец Г. М., Алкснис Е. Г., Парфенова Н. С., Климов А. Н. (1988) Акцепция холестерина из мембран эритроцитов подфракцией ЛПВП2, роль лецитин-холестерин-ацилтрансферазы в этом процессе, *Биохимия*, **53**, 1334-1338.
4. Shah, P. K., Kaul, S., Nilsson, J., and Cercek, B. (2001) Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, *Circulation*, **104**, 2376-2383, doi: 10.1161/hc4401.098467.
5. Hyka, N., Dayer, J. M., Modoux, C., Kohno, T., Edwards, C. K. 3rd, et al. (2001) Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1β and tumor necrosis factor-α by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes, *Blood*, **97**, 2381-2389, doi: 10.1182/blood.v97.8.2381.
6. Burger, D., and Dayer, J. M. (2002) High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun. Rev.*, **1**, 111-117, doi: 10.1016/s1568-9972(01)00018-0.

7. Wadham, C., Albanese, N., Roberts, J., Wang, L., Bagley, C. J., et al. (2004) High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity, *Circulation*, **109**, 2116-2122, doi: 10.1161/01.CIR.0000127419.45975.26.
8. Connelly, M. A., and Williams, D. L. (2004) SR-BI and HDL cholesteryl ester metabolism, *Endocr. Res.*, **30**, 697-703, doi: 10.1081/erc-200043979.
9. Walsh, A., Ito, Y., and Breslow, J. L. (1989) High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6488-6494.
10. Mogilenko, D. A., Orlov, S. V., Trulioff, A. S., Ivanov, A. V., Nagumanov, V. K., et al. (2012) Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages, *FASEB J.*, **26**, 2019-2030, doi: 10.1096/fj.11-193946.
11. Shavva, V. S., Mogilenko, D. A., Nekrasova, E. V., Trulioff, A. S., Kudriavtsev, I. V., et al. (2018) Tumor necrosis factor alpha stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF- $\kappa$ B, and nuclear receptors PPAR $\alpha$  and LXRs, *Mol. Cell. Biochem.*, **448**, 211-223, doi: 10.1007/s11010-018-3327-7.
12. Bogomolova, A. M., Shavva, V. S., Nikitin, A. A., Nekrasova, E. V., Dizhe, E. B., et al. (2019) Hypoxia as a factor involved in the regulation of the apoA-1, ABCA1, and complement C3 gene expression in human macrophages, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 529-539, doi: 10.1134/S0006297919050079.
13. Major, A. S., Dove, D. E., Ishiguro, H., Su, Y. R., Brown, A. M., et al. (2001) Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (ApoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in ApoAI(–/–) mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1790-1795, doi: 10.1161/hq1101.097798.
14. Ishiguro, H., Yoshida, H., Major, A. S., Zhu, T., Babaev, V. R., et al. (2001) Retrovirus-mediated expression of apolipoprotein A-I in the macrophage protects against atherosclerosis *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 36742-36748, doi: 10.1074/jbc.M106027200.
15. Su, Y. R., Ishiguro, H., Major, A. S., Dove, D. E., Zhang, W., et al. (2003) Macrophage apolipoprotein A-I expression protects against atherosclerosis in ApoE-deficient mice and up-regulates ABC transporters, *Mol. Ther.*, **8**, 576-583, doi: 10.1016/s1525-0016(03)00214-4.
16. Su, Y. R., Blakemore, J. L., Zhang, Y., Linton, M. F., and Fazio, S. (2008) Lentiviral transduction of apoAI into hematopoietic progenitor cells and macrophages: applications to cell therapy of atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1439-1446, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.160093.
17. Higuchi, K., Law, S. W., Hoeg, J. M., Schumacher, U. K., Meglin, N., and Brewer, H. B. Jr. (1988) Tissue-specific expression of apolipoprotein A-I (ApoA-I) is regulated by the 5'-flanking region of the human *ApoA-I* gene, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18530-18536.
18. Widom, R. L., Ladas, J. A., Kouidou, S., and Karathanasis, S. K. (1991) Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 677-687, doi: 10.1128/mcb.11.2.677.
19. Mogilenko, D. A., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., and Orlov, S. V. (2019) Characterization of distal and proximal alternative promoters of the human *ApoA-I* gene, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **53**, 485-496, doi: 10.1134/S0026898419030121.
20. Huuskonen, J., Vishnu, M., Chau, P., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2006) Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells, *Biochemistry*, **45**, 15068-15074, doi: 10.1021/bi061378y.
21. Ge, R., Rhee, M., Malik, S., and Karathanasis, S. K. (1994) Transcriptional repression of apolipoprotein AI gene expression by orphan receptor ARP-1, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13185-13192.
22. Shavva, V. S., Mogilenko, D. A., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., et al. (2016) PPAR $\gamma$  represses apolipoprotein A-I gene but impedes TNF $\alpha$ -mediated ApoA-I downregulation in HepG2 cells, *J. Cell. Biochem.*, **117**, 2010-2022, doi: 10.1002/jcb.25498.
23. Chan, J., Nakabayashi, H., and Wong, N. C. (1993) HNF4 increases activity of the rat ApoA1 gene, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1205-1211, doi: 10.1093/nar/21.5.1205.
24. Rottman, J. N., Widom, R. L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V., and Karathanasis, S. K. (1991) A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3814-3820, doi: 10.1128/mcb.11.7.3814.
25. Martin, C., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., et al. (2001) Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR $\alpha$  and induces HDL apoA-I, *J. Clin. Invest.*, **107**, 1423-1432, doi: 10.1172/JCI10852.
26. Harnish, D. C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R., and Karathanasis, S. K. (1996) Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4, *J. Biol. Chem.*, **271**, 13621-13628, doi: 10.1074/jbc.271.23.13621.
27. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., et al. (2017) FOXO1 and LXR $\alpha$  downregulate the apolipoprotein A-I gene expression during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 123-134, doi: 10.1007/s12192-016-0749-6.
28. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Tanyanskiy, D. A., et al. (2017) Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXR $\beta$  transcription factors, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 382-396, doi: 10.1002/jcb.25651.
29. Libby, P., and Theroux, P. (2005) Pathophysiology of coronary artery disease, *Circulation*, **111**, 3481-3488, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878.
30. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., and Santanam, N. (2010) Oxidized low density lipoprotein, *Methods Mol. Biol.*, **610**, 403-417, doi: 10.1007/978-1-60327-029-8\_24.
31. Feng, Y., Cai, Z. R., Tang, Y., Hu, G., Lu, J., et al. (2014) TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expressions in human umbilical vein endothelial cells, *Genet. Mol. Res.*, **13**, 680-695, doi: 10.4238/2014.
32. Yu, X.-H., Fu, Y.-C., Zhang, D.-W., Yin, K., and Tang, C.-K. (2013) Foam cells in atherosclerosis, *Clin.*

- Chim. Acta*, **424**, 245-252, doi: 10.1016/j.cca.2013.06.006.
33. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., and Orekhov, A. N. (2017) Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **95**, 1153-1165, doi: 10.1007/s00109-017-1575-8.
  34. Chávez-Sánchez, L., Garza-Reyes, M. G., Espinosa-Luna, J. E., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M. V., and Blanco-Favela, F. (2014) The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans, *Hum. Immunol.*, **75**, 322-329, doi: 10.1016/j.humimm.2014.01.012.
  35. Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., et al. (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer, *Nat. Immunol.*, **11**, 155-161, doi: 10.1038/ni.1836.
  36. Yang, K., Liu, X., Liu, Y., Wang, X., Cao, L., et al. (2017) DC-SIGN and Toll-like receptor 4 mediate oxidized low-density lipoprotein-induced inflammatory responses in macrophages, *Sci. Rep.*, **3296**, 1-11, doi: 10.1038/s41598-017-03740-7.
  37. Kannan, Y., Sundaram, K., Narasimhulu, C. A., Parthasarathy, S., and Wewers, M. D. (2012) Oxidatively modified low density lipoprotein (LDL) inhibits TLR2 and TLR4 cytokine responses in human monocytes but not in macrophages, *J. Biol. Chem.*, **287**, 23479-23488, doi: 10.1074/jbc.M111.320960.
  38. Bzowska, M., Nogiec, A., Skrzeczyńska-Moncznik, J., Mickowska, B., Guzik, K., and Pryjma, J. (2012) Oxidized LDLs inhibit TLR-induced IL-10 production by monocytes: a new aspect of pathogen-accelerated atherosclerosis, *Inflammation*, **35**, 1567-1584, doi: 10.1007/s10753-012-9472-3.
  39. Bennett, S., and Breit, S. N. (1994) Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV, *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 236-240, doi: 10.1002/jlb.56.3.236.
  40. Khan, B. V., Parthasarathy, S. S., Alexander, R. W., and Medford, R. M. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, **95**, 1262-1270, doi: 10.1172/JCI117776.
  41. Jialal, I., and Chait, A. (1989) Differences in the metabolism of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein by human endothelial cells: inhibition of cholesterol esterification by oxidatively modified low density lipoprotein, *J. Lipid Res.*, **30**, 1561-1568.
  42. Scoccia, A. E., Molinuevo, M. S., McCarthy, A. D., and Cortizo, A. M. (2001) A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins, *BMC Clin. Pathol.*, **1**, 1, doi: 10.1186/1472-6890-1-1.
  43. Esterbauer, H., and Cheeseman, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.*, **186**, 407-421, doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-h.
  44. Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Shavva, V. S., Lapikov, I. A., Orlov, S. V., and Perevozchikov, A. P. (2009) Role of the nuclear receptors HNF4 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and LXRs in the TNF $\alpha$ -mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells, *Biochemistry*, **48**, 11950-11960, doi: 10.1021/bi9015742.
  45. Mogilenko, D. A., Kudriavtsev, I. V., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., Vilenskaya, E. G., et al. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic derived cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 1726-1738, doi: 10.1074/jbc.M112.437525.
  46. Yao, S., Miao, C., Tian, H., Sang, H., Yang, N., et al. (2014) Endoplasmic reticulum stress promotes macrophage-derived foam cell formation by up-regulating cluster of differentiation 36 (CD36) expression, *J. Biol. Chem.*, **289**, 4032-4042, doi: 10.1074/jbc.M113.524512.
  47. Sanda, G. M., Deleanu, M., Toma, L., Stancu, C. S., Simionescu, M., and Sima, A. V. (2017) Oxidized LDL-exposed human macrophages display increased MMP-9 expression and secretion mediated by endoplasmic reticulum stress, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 661-669, doi: 10.1002/jcb.25637.
  48. Bae, Y. S., Lee, J. H., Choi, S. H., Kim, S., Almazan, F., et al. (2009) Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2, *Circ. Res.*, **104**, 210-218, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181040.
  49. Park, Y. M. (2014) CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis, *Exp. Mol. Med.*, **46**, e99, doi: 10.1038/emmm.2014.38.
  50. Yang, H. Y., Bian, Y. F., Zhang, H. P., Gao, F., Xiao, C. S., et al. (2015) LOX-1 is implicated in oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress of macrophages in atherosclerosis, *Mol. Med. Rep.*, **12**, 5335-5341, doi: 10.3892/mmr.2015.4066.
  51. Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., et al. (2001) A PPAR $\gamma$ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis, *Mol. Cell*, **7**, 161-171, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00164-2.
  52. Hopkins, P. N. (2013) Molecular biology of atherosclerosis, *Physiol. Rev.*, **93**, 1317-1542, doi: 10.1152/physrev.00004.2012.
  53. Eichelbaum, K., and Krijgsveld, J. (2014) Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis, and secretion during macrophage activation, *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 792-810, doi: 10.1074/mcp.M113.030916.
  54. Clerck, A., and Sugden, P. H. (1998) The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs), *FEBS Lett.*, **426**, 93-96, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00324-x.
  55. Morishima, A., Ohkubo, N., Maeda, N., Miki, T., and Mitsuda, N. (2003) NF $\kappa$ B regulates plasma apolipoprotein A-I and high density lipoprotein cholesterol through inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J. Biol. Chem.*, **278**, 38188-38193, doi: 10.1074/jbc.M306336200.

## REGULATION OF THE APOLIPOPROTEIN A-I GENE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES BY OXIDATED LOW DENSITY LIPOPROTEIN

E. V. Nekrasova<sup>1</sup>, E. E. Larionova<sup>1</sup>, K. Danko<sup>2</sup>, D. O. Kuzmina<sup>2</sup>,  
V. S. Shavva<sup>1</sup>, I. V. Kudriavtsev<sup>1</sup>, and S. V. Orlov<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Experimental Medicine, 197376 St. Petersburg, Russia; E-mail: serge@iem.sp.ru*

<sup>2</sup> *St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: s.orlov@spbu.ru*

Apolipoprotein A-I (ApoA-I) is a key component of reverse cholesterol transport in humans. In the previous studies, we demonstrated expression of the *apoA-I* gene in human monocytes and macrophages; however, little is known on the regulation of the *apoA-I* expression in macrophages during the uptake of modified low-density lipoprotein (LDL), which is one of the key processes in the early stages of atherogenesis leading to formation of foam cells. Here, we demonstrate a complex nature of the *apoA-I* regulation in human macrophages during the uptake of oxidized LDL (oxLDL). Incubation of macrophages with oxLDL induced expression of the *apoA-I* gene within the first 24 h, but suppressed it after 48 h. Both effects depended on the interaction of oxLDL with the TLR4 receptor, rather than on the oxLDL uptake by the macrophages. The oxLDL-mediated downregulation of the *apoA-I* gene depended on the ERK1/2 and JNK cascades, as well as on the NF-κB cascade.

**Keywords:** atherosclerosis, oxLDL, macrophages, THP-1, foam cells, TLR4 receptor, *apoA-I* gene

УДК 577.112

## РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ – КОМПОНЕНТОВ ЭПИТОПНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19

© 2021 А.С. Карягина<sup>1,2,3\*</sup>, А.В. Громов<sup>1</sup>, Т.М. Грунина<sup>1,2</sup>, А.М. Ляшук<sup>1</sup>, А.В. Гришин<sup>1</sup>, Н.В. Струкова<sup>1</sup>, М.С. Генералова<sup>1</sup>, З.М. Галушкина<sup>1</sup>, Л.А. Соболева<sup>1</sup>, О.Ю. Добрынина<sup>1</sup>, Т.Н. Большакова<sup>1</sup>, М.Е. Субботина<sup>1,2\*</sup>, Е.А. Романовская-Романько<sup>4</sup>, И.В. Красильников<sup>5</sup>, Н.Б. Поляков<sup>1,6</sup>, А.И. Соловьев<sup>1</sup>, Д.А. Грумов<sup>1</sup>, В.Г. Жуховицкий<sup>1</sup>, Е.И. Рябова<sup>1</sup>, В.В. Прокофьев<sup>1</sup>, В.Г. Лунин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: akaryagina@gmail.com, subbotinat@gmail.com

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия

<sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева Минздрава России, 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток ФМБА России, 198320 Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> Институт геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.06.2021

После доработки 11.07.2021

Принята к публикации 28.07.2021

Нами разработана новая платформа для создания антикоронавирусных эпитопных вакцин. Из рецептор-связывающего мотива Spike-белка вируса SARS-CoV-2 были выбраны два петлеобразных эпитопа длиной 22 и 42 аминокислотных остатка, реализующих большое количество белок-белковых взаимодействий в комплексах с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) и нейтрализующими антителами. Нами проведено конструирование двух типов гибридных белков, включающих один из двух выбранных эпитопов. Для фиксации конформации выбранных эпитопов применялся подход с использованием белковых каркасов. В качестве эпитопного каркаса для сближения C- и N-концов петлеобразных эпитопов использован гомолог белка Ror из плазмиды *Escherichia coli* ColE1, в структуре которого присутствует мотив «спираль–поворот–спираль». Петлеобразные эпитопы встраивали в область поворота; конформация дополнительно фиксировалась дисульфидной связью, образующейся между остатками цистеинов, присутствующих в составе эпитопов. С целью мултимеризации к эпитопам, встроенным в Ror-подобный белок, присоединяли либо альдолазу из *Thermotoga maritima*, формирующую в растворе тример, либо  $\alpha$ -спиральный тримеризатор Spike-белка SARS-CoV-2. Для обеспечения возможности очистки на гепарин-содержащих сорбентах на C-конец гибридных белков ввели короткий фрагмент из гепарин-связывающего гемагглютинина *Mycobacterium tuberculosis*. Все полученные белки демонстрировали высокий уровень иммуногенности после трехкратного парентерального введения мышам. Сыворотки мышей, иммунизированных обоими гибридными белками на основе альдолазы, а также белком на основе тримеризатора Spike-белка SARS-CoV-2, несущим более длинный эпитоп, в высоком титре взаимодействовали как с инактивированным вирусом SARS-CoV-2, так и с рецептор-связывающим доменом Spike-белка. Представленная разработка в перспективе может быть использована для создания новых эпитопных вакцин для профилактики вирусных инфекций.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** SARS-CoV-2, Spike-белок, RBD, RBM, эпитопная вакцина, эпитоп, альдолаза.

**DOI:** 10.31857/S0320972521100043

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреитол; ИАА – иодацетамид; ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; ALD – альдолаза; BCA – бицинониновая кислота; COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 г. (Coronavirus Disease 2019); DPBS – физиологический раствор Дульбекко с фосфатным буфером; HBD – гепарин-связывающий домен; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; PBS – натрий-фосфатный буфер; RBD – рецептор-связывающий домен; RBM – рецептор-связывающий мотив; Tri –  $\alpha$ -спираль, опосредующая тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

В случае перехода COVID-19 в разряд сезонных заболеваний население всего мира будет нуждаться в периодической вакцинации подобно тому, как это происходит в рамках профилактики гриппа, что делает разработку новых вариантов высокоэффективных, безопасных и недорогих вакцин для профилактики COVID-19 чрезвычайно актуальной задачей. Одна из проблем целновиреонных вакцин (белковых вакцин, включающих полноразмерные вирусные белки) и векторных вакцин (РНК-вакцин, приводящих к выработке в организме вирусных белков) заключается в том, что не все индуцируемые ими антитела являются протективными [1]. Более того, в определенных обстоятельствах могут образовываться антитела, способствующие более тяжелому течению заболевания при заражении после вакцинирования (феномен антителозависимого усиления инфекции) [2–4]. Одним из перспективных подходов, позволяющих заведомо избежать ряда проблем, включая вышеперечисленные, является разработка так называемых эпитопных вакцин — вакцин, действующим началом которых являются отдельные небольшие белковые эпитопы инфекционного агента. У них нет недостатков, характерных для живых вакцин (реверсия патогенных свойств, остаточная вирулентность, неполная инаktivация и т.п.). К тому же такие вакцины отличаются высокой стандартностью, обладают слабой реактогенностью, с их помощью можно избежать как развития аутоиммунных процессов при иммунизации, так и образования непротективных антител и антител, способствующих развитию антителозависимого усиления инфекции.

Основой успешного функционирования эпитопных вакцин является правильный подбор эпитопов — участков поверхности вирусных белков, способных эффективно индуцировать образование нужного спектра антител. Адекватный выбор эпитопов может нацелить иммунную систему на выработку только вируснейтрализующих антител. В случае вируса SARS-CoV-2 выбор эпитопов может быть основан непосредственно на данных о структуре комплексов поверхностного, отвечающего за проникновение в клетку, белка Spike с вируснейтрализующими антителами человека. Такая возможность обеспечивается быстрым накоплением необходимых структурных данных: так, весной—летом 2020 г. были опубликованы первые данные, описывающие структуру комплексов [5], а на конец мая 2021 г. в базе данных Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) было депонировано уже 200 структур комплексов Spike-белка с антителами. Нейтрализующие антитела, взаимодействующие со Spike-белком, можно разделить

на несколько классов в соответствии с областью взаимодействия. Многочисленным является класс нейтрализующих антител, которые непосредственно препятствуют взаимодействию Spike-белка с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2), инициирующему проникновение вируса в клетку. Эти антитела контактируют с аминокислотными остатками (а.о.), расположенными в так называемом рецептор-связывающем мотиве (RBM, 437–508 а.о.), поэтому выбирать детерминанты для эпитопных вакцин представляется целесообразным в пределах данного мотива.

Другим важным аспектом успешности эпитопных вакцин является решение проблемы низкой иммуногенности за счет обеспечения оптимального экспонирования эпитопов и их мультемеризации. Наиболее перспективные современные разработки в этой области связаны с использованием подходов на основе так называемых эпитопных каркасов. Под эпитопными каркасами, как правило, подразумеваются белки-носители, к которым генно-инженерным или другим способом присоединяются пептидные эпитопы [6, 7]. В качестве белков-носителей часто используют белки, формирующие тримерные, тетрамерные или гексамерные структуры. При этом короткие линейные детерминанты, по-видимому, за счет самопроизвольного формирования нативной укладки, способны индуцировать выработку протективных антител даже просто при N-концевом расположении относительно каркасного белка [6]. Достаточно протяженные линейные эпитопы вирусных белков, образующие многочисленные контакты в комплексах с антителами, в структуре вирусного белка могут быть представлены петлеобразными структурами со сближенными N- и C-концами. В этом случае каркасный белок может быть использован для фиксации вблизи друг друга концов петлеобразных участков белка подобно тому, как это сделано в работе Juraja et al. [8]. Можно надеяться, что при таком подходе в значительной мере будет обеспечено конформационное соответствие эпитопа его нативной конформации в составе полноразмерного антигена.

Целью настоящей работы являлась разработка новой платформы для создания белковых компонентов эпитопных антикоронавирусных вакцин на основе эпитопного каркаса для фиксации конформации, а также домена для мультемеризации (тримеризации) эпитопов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штамм и векторы.** В работе использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* BL21

(DE3) (*E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>m</sub><sup>-</sup>) *gal* λ(DE3) («Agilent Technologies», США), модифицированный плазмидный вектор pQE6 («Qiagen», США), в котором промотор T5 заменен на T7, и плазмиду pRep4 из *E. coli* M15 [pRep4] («Qiagen»).

**Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD.** Белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD включает аминокислотную последовательность α-спирали Rop-подобного белка из *Methylococcus capsulatus* (2–34 а.о., PDB-код: 2JS5\_A, идентификатор RefSeq: WP\_010959602), последовательность детерминанты D2 рецептор-связывающего мотива (RBM, receptor-binding motif) Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (470–490 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2), последовательность второй α-спирали Rop-подобного белка (34–65 а.о.), последовательность α-спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (958–991 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2) и короткий участок гепарин-связывающего гемагглютини-на HBHA из *Mycobacterium tuberculosis*, соответствующий гепарин-связывающему домену (HBD, heparin-binding domain) (160–174 а.о., идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: A1KFU9), а также дополнительные остатки, представляющие собой линкерные последовательности, и остатки, соответствующие нуклеотидным последовательностям с введенными рестрикционными сайтами. Нуклеотидная последовательность соответствующего химерного гена была спланирована таким образом, чтобы на ее 5'-конце находились сайты NcoI и BamHI, а на 3'-конце – сайты BglII и Kpn2I. Участок, кодирующий детерминанту D2, был фланкирован сайтами AgeI и Eco8II. Оптимизацию кодонного состава синтетического гена проводили с помощью программы JCat (<http://www.jcat.de/>), корректировку вторичной структуры транскрибируемой РНК – с помощью веб-сервера DINAMelt (<http://www.unafold.org/Dinamelt/applications/two-state-melting-folding.php>). Синтетический ген встраивали в модифицированный плазмидный вектор pQE6 по сайтам NcoI и Kpn2I, в результате была получена плаزمид рL1003, кодирующая белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD. Все синтетические гены, использованные в работе, получены в компании «Евроген» (Россия).

**Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD.** Фрагмент ДНК, кодирующий детерминанту D3 рецептор-связывающего мотива (RBM) Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (453–494 а.о., идентифи-

катор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2), фланкированную сайтами AgeI и Eco8II, был оптимизирован по кодонному составу и вторичной структуре мРНК (синтезирован компанией «Евроген») и клонирован в плазмиду рL1003 по сайтам AgeI и Eco8II. В результате была получена плазмид рL1008, кодирующая белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD, аналогичный по структуре белку Rop-D2-Rop-Tri-HBD, за исключением участка антигенной детерминанты Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

**Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD.** Белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD включает те же участки аминокислотных последовательностей различных белков, что и белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD, за исключением того, что последовательность α-спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri), заменена на последовательность альдозазы из *Thermotoga maritima* (2–201 а.о., PDB-код: 1WA3). Нуклеотидная последовательность гена была оптимизирована по кодонному составу и вторичной структуре мРНК и спланирована таким образом, чтобы на ее 5'-конце находились сайты NcoI и BamHI, а на 3'-конце – сайты BglII и Kpn2I. Участок, кодирующий детерминанту D2, был фланкирован сайтами AgeI и Eco8II. Синтетический ген встраивали в модифицированную плазмиду pQE6 по сайтам NcoI и Kpn2I. В результате была получена плазмид рL989, кодирующая белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD.

**Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD.** Фрагмент, кодирующий детерминанту D3 из плазмиды рL1008, был клонирован в плазмиду рL989 по сайтам AgeI и Eco8II. Полученная плазмид рL990 кодирует белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD, аналогичный по структуре белку Rop-D2-Rop-ALD-HBD, за исключением участка антигенной детерминанты Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

**Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-RBM-Rop.** Белок Rop-RBM-Rop включает две аминокислотные последовательности Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (2–34 и 35–66 а.о., PDB-код: 2JS5\_A, идентификатор RefSeq: WP\_010959602), участок, включающий RBM белка вируса SARS-CoV-2 (433–511 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2), а также аминокислотные остатки линкерных последовательностей и остатки, соответствующие нуклеотидным последовательностям с рестрикционными сайтами. На 5'-конце нуклеотидной последовательности были вставлены сайты NcoI и BamHI, а на 3'-конце – BglII и Kpn2I. Синтетический ген встраивали в модифициро-

ванный плазмидный вектор pQE6, несущий T7-промотор вместо T5-промотора, по сайтам NcoI и KpnII. В результате была получена плаزمида pL926, кодирующая белок Rop-RBM-Rop.

Во всех случаях правильность сборки последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

**Выращивание штаммов-продуцентов.** Культуры трансформированных клеток *E. coli* выращивали в среде LB (lysogeny broth) с добавлением канамицина (25 мг/л) и ампициллина (200 мг/л) на качалке при 180 об./мин и 37 °C до достижения OD<sub>600</sub> 1,0–1,2. Синтез белка индуцировали добавлением 0,5 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид), затем культуры выращивали еще 4 ч при 180 об./мин. Продуценты нерастворимых белков культивировали при 37 °C, растворимых — при 30 °C. Полученные культуры клеток центрифугировали в течение 30 мин при 5000 g и 10 °C. Биомассу хранили при –20 °C.

**Разрушение клеток *E. coli*.** Размороженную биомассу бактериальных клеток (1 г) суспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF)) в соотношении не менее чем 1 : 10 (w/v) соответственно, добавляли 100 мкг/мл лизоцима, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и разрушали на ультразвуковой установке Vibra-Cell VCX750 («Sonic», США) (40%-ная амплитуда, 2,5 мин с перерывами 3 с через 2 с) во льду. Смесь центрифугировали в течение 30 мин при 20 000 g и 10 °C, при этом белки растворимой фракции оставались в надосадочной жидкости, а нерастворимой фракции — в осадке в виде телец включения. Оба белка с α-спиралью-тримеризатором (Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD), а также белок Rop-RBM-Rop были получены в виде телец включения, белки с альдолазой (Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD) — преимущественно в растворимой форме, поэтому они оставались в супернатанте.

**Подготовка к хроматографии белков в форме телец включений.** Отмывку телец включения проводили дважды лизирующим буфером и один раз 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Отмытые тельца включения, содержащие белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD, растворяли в 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) в объеме, равном объему, использованному для лизиса биомассы клеток, центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g.

**Подготовка к хроматографии растворимых белков.** Фракции супернатанта белков Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD после лизиса разводили буфером (20 мМ Tris-HCl

(pH 8,0), 1% Triton X-100) до концентрации ~1 мг/мл и прогревали при 65 °C в течение 15 мин на магнитной мешалке с подогревом MR 3001 («Heidolph», Германия). Центрифугировали при 9000 g в течение 30 мин, при этом целевой белок оставался преимущественно в надосадочной жидкости, а примесные белки штамма — в основном в осадке.

**Колоночная хроматография.** Колоночную хроматографию проводили с применением хроматографической установки низкого давления ÄKTA start («GE Healthcare Life Sciences», США). Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм с помощью набора Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay («AppliChem», Германия). Для подготовки образцов белка к электрофорезу в ПААГ по Лэммли использовали буфер с восстановителем 0,2 М дитиотреитолом (ДТТ) или без него в растворе, содержащем 2 мМ ЭДТА, 125 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 20%-ный глицерин, 4%-ный додецилсульфат натрия и 0,015%-ный бромфеноловый синий. Пробы белка разводили буфером в соотношении 1 : 1, прогревали 5 мин при 95 °C и центрифугировали 5 мин при 16 000 g, супернатант наносили на ПААГ. Электрофорез проводили с использованием прибора SE 260 Mighty Small II («Amersham», США) и набора аксессуаров компании «GE Healthcare» (США). После электрофореза гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R250 («Bio-Rad», США). Для оценки кажущейся молекулярной массы использовали белковые маркеры 14–97 кДа («Bio-Rad»). Документирование гелей проводили с помощью системы гель-документирования Gel Doc™ XR+ («Bio-Rad»). Денситометрическую оценку полос на геле осуществляли с помощью программного обеспечения Quantity One («Bio-Rad»).

**Хроматография белков из телец включений на сорбенте WorkBeads 40S.** Подготовленные для хроматографии белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD и Rop-RBM-Rop наносили на колонку с 6 мл сорбента WorkBeads 40S («Bio-Works», Швеция), уравновешенного раствором 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), со скоростью 1 мл/мин, промывали со скоростью 2 мл/мин до выхода поглощения на плато. С той же скоростью проводили элюцию раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М в объеме 60 мл) в том же буферном растворе. Элюат с колонки собирали фракциями объемом по 5 мл, затем фракции элюата с максимальным поглощением при 280 нм объединяли и диализовали против раствора 4 М мочевины в 25 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0) в течение 24 ч при 4 °C и центрифугировали в течение

30 мин при 9 000 g. Соотношение объемов диализуемого образца и буфера для диализа составляло 1 : 10 соответственно. Растворы белков (здесь и далее) диализовали с использованием целлюлозной диализной мембраны Zellu Trans/ROTH 3,5 E657.1 («Carl Roth», Германия) толщиной 25 мкм и нижним порогом пропускания 3500 Да. После диализа проводили электрофорез объединенных фракций и оценку концентрации белка по поглощению раствора при 280 нм с помощью ВСА.

**Хроматография растворимых белков на сорбенте WorkBeads 40S.** Подготовленные для хроматографии белки Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD фильтровали продавливанием через мембранный шприцевый фильтр из полиэфирсульфона (PES) с диаметром пор 0,45 мкм («Corning», США). Фильтрат наносили на колонку с 10 мл сорбента WorkBeads 40S, уравновешенного 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, со скоростью 1 мл/мин, промывали со скоростью 2 мл/мин до выхода поглощения на плато. С той же скоростью проводили элюцию раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М в объеме 100 мл) в том же буферном растворе, элюат с колонки собирали фракциями объемом по 4 мл, затем объединяли фракции, соответствующие максимальному поглощению при 280 нм, и диализовали против буфера, содержавшего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), в течение 24 ч, центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g. Соотношение объемов диализуемого образца и буфера для диализа составляло 1 : 10 соответственно. Затем отбирали супернатант и проводили электрофорез полученных белков и оценку концентрации белков по поглощению раствора при 280 нм с помощью ВСА.

**Аффинная хроматография белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD на гепарин-сефарозе CL-6B.** Полученный раствор белка после диализа подвергали колоночной аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе CL-6B («GE Healthcare»). Колонку с 10 мл сорбента уравновешивали раствором 4 М мочевины в 20 mM Tris-HCl буфере (pH 8,0), связывание белка и промывание колонки проводили в том же буфере, все операции — со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали градиентом концентрации NaCl 0–1 М в растворе 4 М мочевины в Tris-HCl буфере (pH 8,0) со скоростью 1 мл/мин. Фракции белка общим объемом 3 мл диализовали против буфера 25 mM Tris-HCl (pH 6,8), постепенно снижая концентрацию мочевины в диализном буфере (ступенями по 0,5 М) в течение 24 ч при 4 °C. Соотношение диализуемого образца и диализного буфера состав-

ляло 1 : 10 соответственно на всех ступенях диализа. После диализа определяли концентрацию и общее количество белка по поглощению раствора при 280 нм с помощью ВСА. Полученные препараты белка лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

**Аффинная хроматография растворимых белков на гепарин-сефарозе CL-6B.** Полученный раствор белков Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD после диализа наносили на колонки с 10 мл сорбента гепарин-сефароза, уравновешенного 20 mM Tris-HCl буфером (pH 8,0). Связывание белка и промывание колонки проводили в том же буфере, все операции — со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали градиентом концентрации NaCl 0–1 М в буфере 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) со скоростью 1 мл/мин. В результате элюции были собраны три фракции по 2 мл. Фракции белка общим объемом 6 мл объединяли и диализовали против буфера 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl в соотношении 1 : 10 соответственно в течение 24 ч при температуре 4 °C с трехкратной сменой буфера. После диализа определяли концентрацию и общее количество белка по поглощению раствора при 280 нм с использованием ВСА. Полученные препараты белка лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

**Хроматография белка Rop-RBM-Rop на сорбенте WorkBeads 40 DEAE.** Раствор белка Rop-RBM-Rop в буфере, содержащем 4 М мочевины и 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), полученный при диализе фракций после хроматографии на WorkBeads 40S, наносили на колонку с 5 мл сорбента WorkBeads 40 DEAE («Bio-Works»), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 4 М мочевины, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0). Все манипуляции с колонкой проводили при скорости потока 1 мл/мин. Промывали сорбент с иммобилизованным на нем белком тем же буфером (50 мл) до падения и стабилизации сигнала УФ-детектора. Элюцию целевого белка проводили градиентом NaCl 0–1 М в 4 М мочевины в том же буфере в пяти объемах колонки. Чистый белок Rop-RBM-Rop содержался во фракции несвязавшегося белка. При элюции с сорбента наряду с целевым белком элюировались также примесные белки. Объединенные белковые фракции (14 мл) несвязавшегося белка инкубировали в буфере для элюции в течение суток, после чего раствор белка диализовали против 1 л 20 mM натрий-фосфатного буфера (pH 5,5) при температуре 4 °C с двукратной сменой буфера.

**Гидролиз белка Rop-RBM-Rop трипсином в ПААГ перед масс-спектрометрическим исследованием.** Белки, разделенные электрофорезом в ПААГ, гидролизовали внутри фрагментов геля

по методике, предложенной Shevchenko et al. [9], с добавлением и без добавления ДТТ и иодацетамиды (ИАА). Триптические пептиды экстрагировали из геля по методике, опубликованной нами ранее [10]. Полученный экстракт высушивали досуха с помощью вакуумного концентратора Savant SPD121P («Thermo Scientific», США) и растворяли в 20 мкл 0,1%-ной муравьиной кислоты. Образец обессоливали на колонках собственного изготовления с обращенно-фазовой мембраной (аналог C18), образец элюировали 90%-ным раствором ацетонитрила в воде. Для нанесения брали 4 мкл образца в 90%-ном ацетонитриле и смешивали их с 1 мкл насыщенного раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в 30%-ном растворе ацетонитрила, содержащем 0,5% ледяной уксусной кислоты (v/v), на стальной мишени, которую затем подсушивали на воздухе при комнатной температуре.

**MALDI масс-спектрометрический анализ.** Анализ пептидов проводили на времяпролетном MALDI масс-спектрометре Ultraflextreme («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Детектирование положительных ионов проводили в режиме рефлектрона при следующих значениях напряжения: IS1 — 20,12 кВ, IS2 — 17,82 кВ; Lens — 7,47 кВ, Ref1 — 21,07 кВ, Ref2 — 10,80 кВ.

Ионы детектировали в диапазоне  $m/z$  650–5000. В качестве внутреннего стандарта использовали пики автолитических фрагментов трипсина и кератина, которые затем были исключены из окончательных списков детектируемых масс.

Фрагментацию отдельных ионов проводили в условиях диссоциации, индуцируемой соударением ионов с молекулами аргона, в режиме детектирования положительных ионов при следующих значениях напряжения: IS1 — 7,50 кВ, IS2 — 6,7 кВ; Lens — 3,50 кВ, Ref1 — 29,50 кВ, Ref2 — 14,00 кВ; Lift1 — 19 кВ, Lift2 — 2,80 кВ. Мощность лазера в процессе съемки масс-спектров варьировали для достижения наилучшей фрагментации исследуемых ионов.

**Анализ данных масс-спектрометрии.** Обработку масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения Flex Analysis 3.4 («Bruker Daltonik GmbH»). К масс-спектрам применяли сглаживание по алгоритму Савицкого–Голе (Savitzky–Golay; ширина 0,2  $m/z$ , 1 цикл) и вычитание базовой линии согласно алгоритму TopHat. Использовали следующие параметры детекции пиков: алгоритм детекции пиков — SNAP2, соотношение сигнал/шум — 3, максимальное число пиков в спектре — 500. Поиск и идентификацию белков методом «пептидного отпечатка» («peptide mass fingerprint») в базе данных осуществляли с помощью програм-

многo комплекса MASCOT (локальная версия 2.1.03, «Matrix Science», Великобритания). При этом использовали следующие параметры поиска: точность определения массы — 50 ppm, возможные посттрансляционные модификации — окисление метионина, гистидина, триптофана, Glu → pyro-Glu, Gln → pyro-Gln. Достоверно идентифицированными (95%,  $p < 0,05$ ) считали белки с вероятностным параметром MOWSE score > 32. Дополнительными критериями достоверности определения первичной структуры белка было совпадение его молекулярной массы со значением, определенным экспериментально.

Интерпретацию масс-спектров, в частности фрагментации, дополнительно проводили с использованием программ Biotoools (версия 3.2) и Proteinscape (версия 4.1) («Bruker Daltonik GmbH»).

**Получение рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного Spike-белка вируса SARS-CoV-2.** Аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (319–541 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2) модифицировали с N-конца сигнальным пептидом щелочной фосфатазы SEAP (MLLLLLLLGLRLQLSLGI) и с C-конца — последовательностью глицин-серинового линкера и гистидиновой метки (GSHH-NNNNNN). Нуклеотидную последовательность полученного полипептида синтезировали в компании «Евроген» и клонировали в плазмиду pCEP по сайтам рестрикции XbaI и HindIII, получая таким образом плазмиду pCEP-RBD. Далее культуру клеток CHO-S («Thermo Fisher Scientific», США) транзientно трансфицировали плазмидой pCEP-RBD с использованием системы CHOgro («Mirus Bio», США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в колбах Эрленмейера при 125 об./мин, 5% CO<sub>2</sub>, 80%-ной влажности, 37 °C, спустя 24 ч снижали температуру до 32 °C и продолжали культивирование в течение 10 дней. Начиная с 3-го дня, добавляли подпитки Cell boosts 7a (2%), 7b (0,2%) («HyClone», США) и 0,5% CHO Bioreactor Feed («Sigma», США) один раз в день. По истечении 10 дней культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 g. Рецептор-связывающий домен очищали металл-аффинной хроматографией на системе ÄKTA start («GE Healthcare Life Sciences»), используя колонки HisTrap FF 5 мл («GE Healthcare Life Sciences») в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера на 20 мМ фосфат натрия, 500 мМ натрия хлорид (pH 7,2) проводили на ко-

лонке ХК 26/100 («GE Healthcare Life Sciences»), заполненной сорбентом Superdex 200 pg («GE Healthcare Life Sciences»).

**Подготовка рекомбинантных белков для иммунизации.** На основе каждого из четырех полученных рекомбинантных белков были подготовлены иммуногенные композиции, содержащие в одной дозе объемом 150 мкл 1 нмоль белка (Rop-D2-Rop-Tri-HBD – 18,7 мкг, Rop-D3-Rop-Tri-HBD – 21,4 мкг, Rop-D2-Rop-ALD-HBD – 36,1 мкг, Rop-D3-Rop-ALD-HBD – 38,7 мкг), а также диэтиламиноэтиловый (ДЭАЭ) декстран 500 – 1 мг, монтанид ISA 201 («Seppic», Франция) – 75 мкл, ретинола пальмитат (100 000 МЕ/мл) производства АО «Ретиноиды» (Россия) – 1,5 мкл.

**Иммунизация лабораторных животных.** В работе использовали самок мышей сингенной инбредной линии BALB/c в возрасте 5–6 недель весом 18–20 г ( $n = 35$ , НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России). Мышам четырех опытных групп ( $n = 7$ ) трехкратно вводили иммуногенные композиции, содержащие рекомбинантные белки, с интервалом в две недели. Инъекцию производили одноразовым стерильным инсулиновым шприцом подкожно в холку животного. Объем раствора для введения составлял 150 мкл. Животным контрольной группы ( $n = 7$ ) по описанной схеме вводили физиологический раствор. Иммунный ответ исследовали через две недели после последней инъекции. В течение всего эксперимента проводили постоянный мониторинг физиологического состояния экспериментальных животных. По истечении двух недель с момента последней инъекции лабораторных животных опытных и контрольной групп вводили в наркоз ингаляцией изофлурана («Piramal Enterprises», Индия) и проводили сбор образцов крови из сердечной полости для определения титра антител в сыворотке крови. После сбора всех индивидуальных образцов крови в вакуумные пробирки их оставляли при комнатной температуре на 20 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 1500 g без охлаждения. Надосадочную жидкость переносили в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Иммуноферментный анализ.** Наличие специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) определяли в образцах сыворотки мышей после трехкратной иммунизации. В качестве антигенов на планшеты сорбировали белки, использованные для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

Препарат вируса был получен путем накопления SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero (банк

ATCC, линия CCL-81) в течение 4 сут. После чего супернатант собирали, центрифугировали при комнатной температуре на скорости 3500 об./мин (1900 g) в течение 10 мин. Для инактивации вируса в надосадочную жидкость добавляли формалин (37%-ный формальдегид) в соотношении 1 : 1000 соответственно. После инкубации вируса с формалином в течение 96 ч проводили ультрацентрифугирование в роторе JA-30.50 в режиме 28 700 об./мин ( $\sim 100\,000\text{ g}$ ) в течение 3 ч при  $+4^{\circ}\text{C}$  через подушку из 30%-ной сахарозы. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в буфере DPBS. Концентрацию белка измеряли на флуориметре Qubit («Invitrogen», США) с использованием набора реагентов Quant-iT Protein Assay Kit («Invitrogen») согласно рекомендациям производителя. Для постановки ИФА использовали препарат формалин-инактивированного вируса в концентрации 1 мкг/мл.

Сорбцию антигенов, разведенных в DPBS до концентрации 1,0 мкг/мл, проводили в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$  в 96-луночных планшетах Maxisorp («Thermo Scientific», Дания) (по 100 мкл на лунку). Затем планшеты дважды отмывали раствором 0,1%-ного Tween-20 («Serva», Германия) в PBS с использованием автоматического промывателя ELx50 («BioTek», США) по 500 мкл на лунку. После отмывки планшеты инкубировали с блокирующим буфером, содержащим PBS и 5% сухого молока («ТФ Дитол», Россия), в течение 2 ч при комнатной температуре, затем повторно отмывали. После чего на планшет вносили серии десятикратных разведений сывороток экспериментальных мышей. Планшеты с сывороткой инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем 3 раза отмывали. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti-Mouse IgG (H+L) («Invitrogen») в разведении 1 : 1200 по 100 мкл на лунку. После инкубации со вторичными антителами планшеты 4 раза отмывали. В качестве цветного субстрата использовали раствор тетраметилбензидина (ТМБ) («Биосервис», Россия) по 100 мкл на лунку с последующей инкубацией в течение 10 мин при комнатной температуре, затем реакцию останавливали добавлением 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Оптическую плотность при длине волны 450 нм измеряли на мультипланшетном ридере с LVF-монохроматорами (на линейных переменных фильтрах) CLARIOstar («BMG Labtech», США).

**Статистический анализ.** Статистические расчеты проводили с помощью пакета программ Statistica 12.0 («Statsoft», США). Данные представляли как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD) либо как среднее геометрическое  $\pm$  стандартное геометрическое отклонение логарифма по

основанию 2 титра сывороток антител. Проверку нормальности распределения проводили с помощью теста Колмогорова—Смирнова. Для оценки статистической значимости различий в данных применяли двухсторонний дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным анализом по Тьюки. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Дизайн рекомбинантных белков.** В работе получены четыре генно-инженерные конструкции, кодирующие химерные белки Ror-D2-Ror-Tri-HBD, Ror-D3-Ror-Tri-HBD, Ror-D2-Ror-ALD-HBD и Ror-D3-Ror-ALD-HBD, иммуногенные свойства которых планировалось исследовать. Белки содержат выбранные нами участки RBM Spike-белка вируса SARS-CoV-2 D2 или D3, многие аминокислотные остатки которых формируют контакты в комплексах с ACE2 и нейтрализующими антителами (рис. 1). Эти участки мы будем далее называть антигенными детерминантами или эпитопами D2 и D3. Последовательности выбранных детерминант перекрываются: D2 соответствует 470—490 а.о., а последовательность D3 — 453—494 а.о. Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (идентификатор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2) (рис. 1). В последовательности D3 в позиции 464 гидрофобный остаток фенилаланина, в нативной структуре Spike-белка обращенный своим гидрофобным радикалом вглубь молекулы и не образующий контактов с антителами, заменен на гидрофильный остаток серина с целью предупреждения возможного образования агрегатов вакцинных белков с D3 за счет гидрофобных взаимодействий. В позиции 484 находится остаток глутаминовой кислоты, во многих штаммах вируса SARS-CoV-2, в частности южно-африканской линии B.1.351, замененный на остаток лизина. В пределах выбранных детерминант находятся два остатка цистеина — в позициях 480 и 488, в нативной структуре Spike-

белка формирующие дисульфидную связь.

Обе детерминанты были выбраны таким образом, чтобы их N- и C-концы были сближены в пространстве в трехмерной структуре Spike-белка (рис. 2), и такое положение можно было зафиксировать за счет присоединенной к ним дополнительной каркасной структуры. Эпитопный каркас во всех четырех белках представлен двумя контактирующими между собой  $\alpha$ -спиралями Ror-подобного белка из *M. capsulatus* (2—34 и 35—66 а.о., PDB-код: 2JS5\_A, идентификатор RefSeq WP\_010959602). Между 34 и 35 а.о. Ror-подобного белка вставляли последовательности D2 или D3. Таким образом, в последовательностях белков обе детерминанты фланкированы  $\alpha$ -спиралями Ror-подобного белка. Помимо сближенности концов, петлеобразная конформация обеих детерминант должна фиксироваться также дисульфидной связью между остатками цистеинов 480 и 488. Наличие дополнительной дисульфидной связи позволяет надеяться на хорошее соответствие нативной конформации участков выбранных детерминант структуре данных участков в составе Spike-белка SARS-CoV-2.

К C-концам гибридных молекул Ror-D2/D3-Ror через линкерную последовательность присоединены домены, обеспечивающие тримеризацию — либо последовательность  $\alpha$ -спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (958—991 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2), либо последовательность альдолазы из *T. maritima* (2—201 а.о., PDB-код: 1WA3). На C-конце всех четырех белков находится короткий участок гепарин-связывающего домена (HBD) белка Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) из *M. tuberculosis* (160—174 а.о., идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: A1KFU9), позволяющий проводить очистку полученных белков на гепарин-содержащих сорбентах. Характеристику четвертичной структуры полученных белков не проводили, но, предположительно, в растворе они должны самопроизвольно формировать гомотримеры — каждый с тремя идентичными петлеобразными структурными эпитопа-



**Рис. 1.** Участок последовательности RBM Spike-белка вируса SARS-CoV-2 и последовательности детерминант D2 и D3. Полужирным шрифтом обозначены а.о., входящие в линейные эпитопы S455—469 и S475—499 (из статьи Lu et al. [7]). Курсивом выделены вариабельные а.о. E484 и N501. Звездочками отмечены а.о., взаимодействующие с ACE2, решетками — а.о., взаимодействующие хотя бы с одним из 13 нейтрализующих антител с известной трехмерной структурой (в соответствии с рис. 2 из работы Lee et al. [11]). Критерий взаимодействия — расстояние между остатками не более 4,5 Å

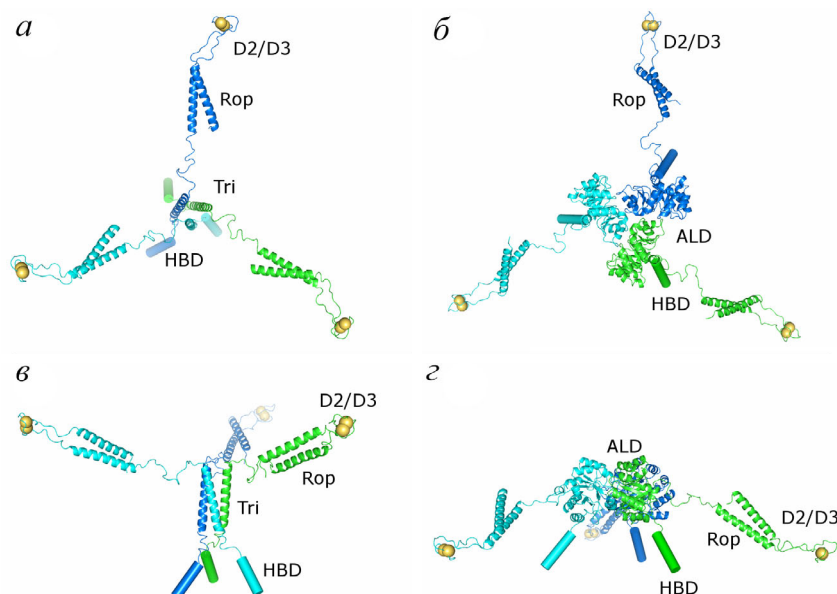


**Рис. 2.** Трехмерная структура белков Rop-D2/D3-Rop-Tri-HBD (а, б) и Rop-D2/D3-Rop-ALD-HBD (б, з). Модели трехмерной структуры рекомбинантных белков построены в программе PyMOL (<https://pymol.org/2/>) и представлены в проекции сверху (а, б) и сбоку (в, з). Для построения моделей использованы структуры Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (PDB-код: 2JS5\_A, 2–66 а.о.), RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (PDB-код: 6VW1, изображена петля D2 (470–490 а.о.); петля D3 (453–494 а.о.), имеющая удлиненную петлеобразную конформацию, не показана),  $\alpha$ -спирали тримеризатора из Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (PDB-код: 1ZVB, 2–34 а.о.) и альдолазы *T. maritima* (PDB-код: 1WA3, 2–201 а.о.). Белки изображены в виде ленточных моделей; образующие дисульфидные связи цистеины – в виде сфер; последовательность а.о. гепарин-связывающего домена (HBD) белка гепарин-связывающего гемагглютинаина из *M. tuberculosis* (160–174 а.о., идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: A1KFU9) – в виде цилиндров (не в масштабе). Разные мономеры изображены разными цветами

ми в *N*-концевой части. Схема строения тримеров полученных гибридных белков показана на рис. 2.

Молекулярная масса мономерных белков – от 18,7 до 38,7 кДа – считается уже достаточной для эффективной выработки антител. Возрастные молекулярной массы при тримеризации должно способствовать дальнейшему усилению иммунного ответа на гибридные антигены.

Для подтверждения существования дисульфидной связи в белках, содержащих петлеобразные фрагменты Spike-белка с Cys480 и Cys488 и полученных синтезом в *E. coli*, был спланирован белок, содержащий полноразмерный RBM, фланкированный последовательностями из Rop-подобного белка. Рецептор-связывающий мотив в нативном Spike-белке образует петлеобразную структуру, включающую на вершине шпильки петлеобразные эпитопы D2 и D3. Цистеины в позициях 480 и 488 входят в состав всех трех фрагментов – RBM, D2 и D3.

**Получение и очистка рекомбинантных белков.** Клонирование генов рекомбинантных белков проводили согласно разделу «Материалы и методы». Все генно-инженерные конструкции обеспечивали высокий уровень экспрессии генов. Белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-

Rop-Tri-HBD и Rop-RBM-Rop нарабатывались в виде телец включений, а белки Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD синтезировались в растворимой форме. Соответственно, схемы выделения этих белков различались: белки с тримеризатором из SARS-CoV-2 и Rop-RBM-Rop выделяли в денатурирующих условиях в присутствии мочевины, а белки с альдолазой – в неденатурирующих условиях (рис. 3). В качестве первой стадии очистки для всех белков использовали сорбент WorkBeads 40S. На второй стадии для четырех белков, используемых впоследствии для иммунизации и содержащих гепарин-связывающий домен, проводили хроматографию на гепарин-сефарозе.

Вторую стадию очистки белка Rop-RBM-Rop проводили с помощью WorkBeads 40 DEAE, при этом большая часть примесных белков прочно связывалась с сорбентом, а основное количество целевого белка не связывалось с сорбентом и после протекания через колонку выходило в высокоочищенном и достаточно концентрированном виде (рис. 3, е, дорожка 2). Выход белков составлял 4,8–8,0 мг на 1 г сырой биомассы, а степень очистки – 97–98%.

Характеристики белков, включающие экспериментальные данные и теоретические значе-

ния некоторых параметров, полученные с использованием интернет-ресурса <https://web.expasy.org/protparam/>, представлены в табл. 1.

**Идентификация белка Rop-RBM-Rop и подтверждение наличия дисульфидной связи в Rop-RBM-Rop и других рекомбинантных белках.** Для

идентификации исследуемого белка интересующие полосы из ПААГ подвергали трипсинолизу, добавляя и не добавляя перед реакцией протеолиза белка в геле восстановитель ДТТ и иодацетамид (ИАА). В присутствии и в отсутствие ДТТ и ИАА S–S-связи в белке должны, соответ-

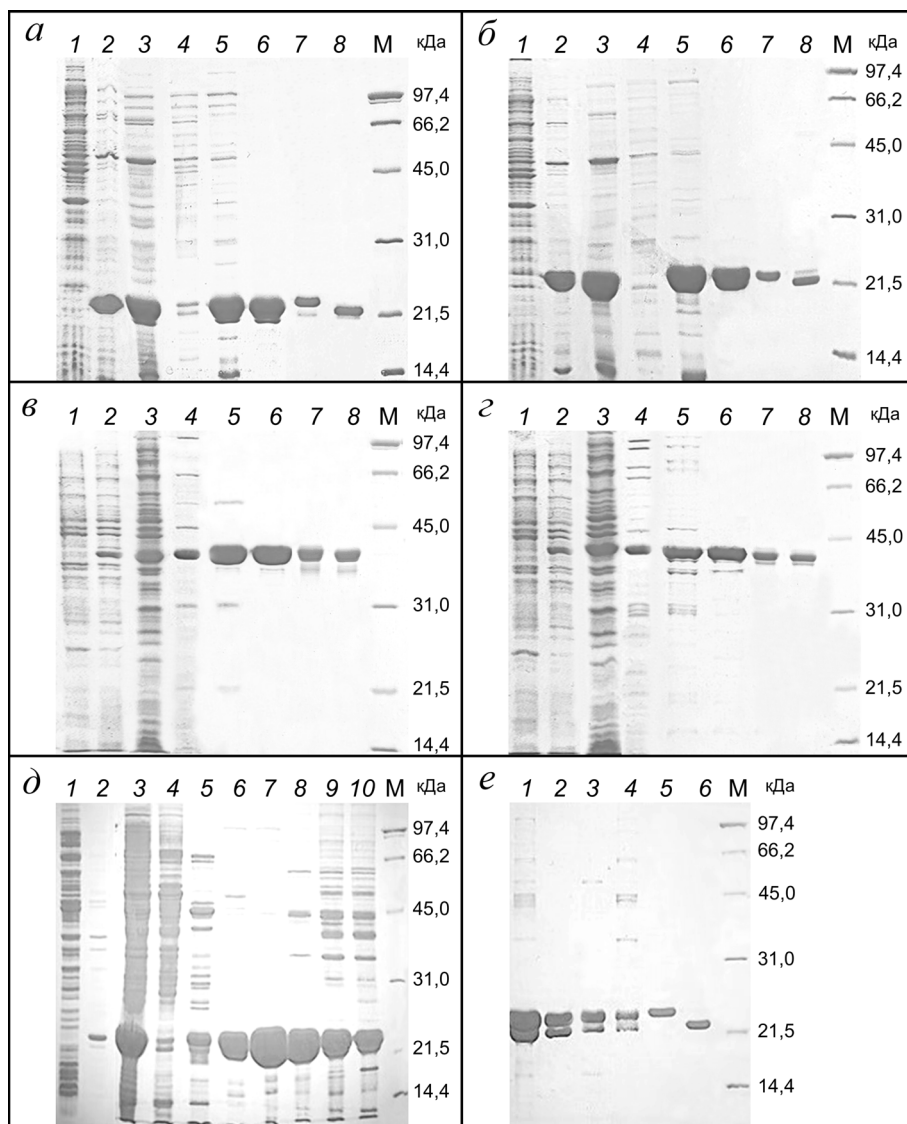


**Рис. 3.** Электрофореграммы разделения препаратов рекомбинантных белков в 12%-ном ПААГ. *а, б* – Очистка и анализ белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD: 1 – белки клетки до индукции ИПТГ; 2 – белки клетки после индукции ИПТГ; 3 – тельца включения после лизиса биомассы штаммов-продуцентов; 4 – супернатант после лизиса биомассы штаммов-продуцентов; 5 – объединенные фракции, полученные при элюции с сорбента WorkBeads 40S; 6 – объединенные фракции, полученные при элюции с гепарин-сефарозы; 7 – образцы белков в присутствии восстановителя ДТТ; 8 – образцы белков без ДТТ; *в, г* – очистка и анализ белков Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD: 1 – белки клетки до индукции ИПТГ; 2 – белки клетки после индукции ИПТГ; 3 – супернатант после лизиса биомассы штаммов-продуцентов; 4 – прогретый супернатант после лизиса биомассы; 5 – объединенные фракции, полученные при элюции с сорбента WorkBeads 40S; 6 – объединенные фракции, полученные при элюции с гепарин-сефарозы; 7 – образцы белков в присутствии ДТТ; 8 – образцы белков без ДТТ; *д* – 1-й этап очистки и анализа белка Rop-RBM-Rop: 1 – супернатант после лизиса биомассы штамма-продуцента; 2 – осадок после лизиса биомассы штамма-продуцента; 3 – белки из осадка, растворенные в 8 М мочеvine; 4 – белки из осадка, не связавшиеся с сорбентом WorkBeads 40S; 5–10 – фракции после элюции; *е* – 2-й этап очистки и анализа белка Rop-RBM-Rop: 1 – объединенные фракции после очистки на WorkBeads 40S; 2 – белок, не связавшийся с WorkBeads 40 DEAE; 3, 4 – фракции после элюции; 5 – белок в присутствии ДТТ; 6 – белок без ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14,4–97,4 кДа («Bio-Rad», США)

Таблица 1. Характеристики полученных в работе рекомбинантных белков

| Параметр                                                                                    | Rop-D2-Rop-Tri-HBD | Rop-D3-Rop-Tri-HBD | Rop-D2-Rop-ALD-HBD  | Rop-D3-Rop-ALD-HBD  | Rop-RBM-Rop      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Молекулярная масса, Да                                                                      | 18 714             | 21 359             | 36 102              | 38 747              | 20 550           |
| Локализация белка после разрушения биомассы                                                 | тельца включения   | тельца включения   | растворимая фракция | растворимая фракция | тельца включения |
| Теоретическая изоэлектрическая точка (pI)                                                   | 8,83               | 9,39               | 8,58                | 9,1                 | 7,73             |
| Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для полностью окисленной формы белка | 0,325              | 0,355              | 0,486               | 0,491               | 1,071            |
| Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для восстановленной формы белка      | 0,318              | 0,349              | 0,483               | 0,488               | 1,065            |

ственно, восстанавливаться (разрушаться) или сохраняться. MALDI масс-спектр полученных пептидов представлен на рис. S1, б, в в Приложении.

После обработки препарата белка ДТТ и ИАА в масс-спектре (рис. S1, в в Приложении) присутствует ряд пиков, соответствующих триптическим и химотриптическим цистеинсодержащим пептидам белка Rop-RBM-Rop, при этом цистеины в данных пептидах присутствуют только в виде карбамидометилцистеинов. Так, пик с  $m/z$  2145,0365 соответствует пептиду DIS-TEIQAGSTPCNGVEGF (77–96 а.о.), пик с  $m/z$  2582,0867 – DISTEIQAGSTPCNGVEGFNCY (77–99 а.о., данный пептид содержит в своем составе два остатка цистеина), пик с  $m/z$  1191,5626 – NCYFPLQSY (97–105 а.о.), пик с  $m/z$  1323,5494 – QAGSTPCNGVEGF (84–96 а.о.). Последовательности пептидов (84–96) и (96–105) дополнительно подтверждены с помощью фрагментации соударением (CID) (данные не приведены). В целом покрытие последовательности пептидами (рис. S1, а в Приложении) составило 100%, что является хорошим результатом и полностью подтверждает структуру исследуемого белка.

При сравнении масс-спектров гидролизатов образцов Rop-RBM-Rop (рис. S1, б, в в Приложении) показано, что в образце, проанализированном в неденатурирующих условиях, не детектируются пики, соответствующие пептидам, содержащим остатки цистеина в виде S-карбамидометилцистеинов, S-пропионамидоцистеинов или пептидам со свободными немодифицированными остатками цистеина, а присутствуют пики, подтверждающие наличие дисульфидной

связи в исследуемом белке. Детальный анализ пиков, соответствующих цистеинсодержащим пептидам, идентифицированным в составе белка Rop-RBM-Rop-DTT-IAA, между цистеинами которых образуется дисульфидная связь, представлен в табл. S1 в Приложении.

Видно, что пикам с  $m/z$  2631,1467; 3791,486; 2561,1583 и 1645,6688 соответствуют две возможные структуры пептидов, однако они имеют одинаковую брутто-формулу и различаются лишь положением, в котором произошло расщепление полипептидной цепи трипсином (выделены курсивом в табл. S1 в Приложении). Кроме того, структура ионов с  $m/z$  2561,044; 2865,261 и 3791,486 дополнительно подтверждена с помощью тандемной масс-спектрометрии. В масс-спектрах фрагментации, индуцированной соударением (CID) (рис. S2 в Приложении), присутствуют пики, соответствующие а-, у- и b-сериям фрагментов соответствующих родительских ионов, структуры которых были предположены на основании анализа масс-спектра триптического гидролизата (рис. S1, в; табл. S1 в Приложении) – этот факт дополнительно подтверждает правильность определения структуры этих ионов.

Таким образом, методом масс-спектрометрии было показано наличие S–S-связи между цистеинами 90 и 98 (480 и 488) в препарате белка Rop-RBM-Rop, полученном синтезом в клетках *E. coli* в виде телец включения с последующей хроматографической очисткой в денатурирующих условиях и рефолдингом посредством диализа.

Для остальных белков масс-спектрометрический анализ не проводили. Образование дисульфидной связи в выделенных белках выявля-

ли по наличию разницы в подвижности полос, соответствующих восстановленной (прогретой при 95 °С в присутствии восстанавливающего агента ДТТ) и невосстановленной формам белка. У белка Rop-RBM-Rop, для которого наличие дисульфидной связи показано с помощью масс-спектрометрии, восстановленная форма имеет меньшую подвижность в геле (рис. 3, е). Аналогичное поведение характерно для всех четырех белков с детерминантами D2 и D3 (рис. 3, а–д). Это подтверждает наличие дисульфидной связи в выделенных белках.

**Образование антител после иммунизации.** Иммуногенные композиции на основе четырех белков были использованы для иммунизации мышей инбредной линии BALB/с. Через 2 недели после трехкратной иммунизации с интервалом в 2 недели определяли наличие специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) в образцах сыворотки мышей. В качестве антигенов использовали те же белки, которые применяли для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Результаты иммунизации представлены в табл. 2.

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, все четыре белка вызывали у мышей образование антител класса IgG, в достаточно высоком титре взаимодействующих как с собственно антигеном, использованным для иммунизации, так и с инактивированным вирусом и RBD. Наиболее иммуногенными являются белки Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD. Наименее иммуногенным является белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD. Наиболее выраженный ответ к RBD наблюдался в случае белка Rop-D3-Rop-ALD-HBD. Наиболее выраженный ответ к инактивированному вирусу SARS-CoV-2 наблюдался в группе животных, иммунизированных белком Rop-D2-ALD-HBD. Описанные сравнения имеют характер наблюдаемых тенденций, поскольку использованный в эксперименте размер выборки (7 животных в группе) является недостаточ-

ным для вывода о статистической достоверности (двухсторонний дисперсионный анализ с применением критерия Тьюки,  $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокие титры антител, взаимодействующих с RBD, полученным в эукариотическом продуценте, а также с инактивированным вирусом SARS-CoV-2 свидетельствуют о том, что полученные в работе рекомбинантные белки, содержащие короткие фрагменты RBM, соответствующие конформационным эпитопам D2 и D3, способны эффективно индуцировать выработку специфических антител. Одним из важных обстоятельств, которое, вероятно, во многом определило эффективную выработку антител, является то, что в пределах выбранных детерминант в Spike-белке отсутствуют сайты гликозилирования, поэтому участки поверхности вируса и RBD в области детерминант D2 и D3 не модифицированы остатками сахаров, как и эпитопы D2 и D3 в полученных в нашей работе белках, синтезированных в бактериальных клетках. В нашем случае присоединение N- и C-концов детерминант D2 и D3 к спиральям Rop-подобного каркасного белка, по-видимому, обеспечивает высокую конформационную схожесть петлеобразных участков D2 и D3 в рекомбинантных белках и в нативном Spike-белке. Об этом также свидетельствует образование характерной дисульфидной связи, непосредственно продемонстрированное для белка Rop-RBM-Rop с помощью масс-спектрометрии и косвенно — для всех четырех белков, использованных для иммунизации (по снижению подвижности восстановленной формы при электрофорезе в ПААГ). В последующем на основе разработанной в нашей работе платформы планируется получение других рекомбинантных белков, включающих перспективные вирусные эпитопы, не обязательно петлеобразные. В том случае, если эти эпитопы будут иметь любую

**Таблица 2.** Среднее геометрическое титра сывороточных антител к различным антигенам в сыворотках мышей после трехкратной иммунизации ( $1/\log_2$  титр)

| Группа мышей | Белок                   | Антиген, использованный при иммунизации | Инактивированный формалином SARS-CoV-2 | RBD              |
|--------------|-------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|------------------|
| 1            | Rop-D2-Rop-Tri-HBD      | $14,21 \pm 1,04$                        | $8,64 \pm 1,00$                        | $10,73 \pm 1,12$ |
| 2            | Rop-D3-Rop-Tri-HBD      | $13,48 \pm 1,19$                        | $9,67 \pm 1,18$                        | $11,44 \pm 1,19$ |
| 3            | Rop-D2-Rop-ALD-HBD      | $> 15,64$                               | $9,88 \pm 1,12$                        | $11,36 \pm 1,17$ |
| 4            | Rop-D3-Rop-ALD-HBD      | $> 15,64$                               | $9,75 \pm 1,10$                        | $12,61 \pm 1,08$ |
| 5            | физиологический раствор | $< 7,0$                                 | $< 7,0$                                | $< 7,0$          |

другую устойчивую конформацию, например,  $\alpha$ -спиральную, или представлять собой участки  $\beta$ -листа, для их присоединения к каркасному Rop-подобному белку будут использованы гибкие глицин-содержащие линкеры. Конформация эпитопов может быть дополнительно стабилизирована за счет замены а.о., не взаимодействующих с антителами и рецептором, на остатки цистеина, которые будут обеспечивать сближение несущих их белковых цепочек за счет образования дисульфидных связей. Такой подход реализован в работе Zuniga et al. [12] по получению эпитопной вакцины на основе коротких фрагментов белка респираторно-синцитиального вируса (RSV), конъюгированных с синтетическими наночастицами.

Наличие в белках тримеризационных доменов, вероятно, приводит к дополнительному усилению иммунного ответа за счет укрупнения антигена. Максимальный эффект наблюдается в случае белков с альдолазой (рис. 2). Способность альдолазы к самопроизвольной мультимеризации часто используют для получения кандидатных вакцин на основе белковых наночастиц, в частности, вакцин на основе RBD коронавируса [13–15]. Альдолаза, используемая в нашей работе, – достаточно крупный по сравнению с вирусными детерминантами белок, поэтому можно предположить, что среди вырабатываемых антител значительная часть антител будет вырабатываться именно на альдолазу и другие дополнительные домены рекомбинантных белков. Тем не менее в многочисленных работах по созданию вакцин на основе вирусных и других белков, способных к самосборке, образующих огромные белковые комплексы (например, из 24-х или 60-ти субъединиц), образования кросспецифичных или аутореактивных антител на белковые компоненты носителя не отмечается [16]. Тем не менее в настоящей работе мы, помимо альдолазы, использовали также другой тримеризатор –  $\alpha$ -спираль из Spike-белка SARS-CoV-2, который существенно меньше по размерам и, следовательно, должен в меньшей степени «перетягивать» на себя «антительный ответ», кроме того, он происходит из того же вируса, что и целевые антигены. Подобный тримеризатор (фолдон – фрагмент белка фибритина из бактериофага T4 длиной 27 а.о.) уже достаточно давно используется для получения кандидатных вакцин на основе вирусных белков, в частности, он содержится в разработанных ранее вакцинах против SARS-CoV и MERS [17, 18]. Данные вакцины и другие белковые вакцины против коронавирусов [13, 15] в качестве антигенного компонента содержат крупные фрагменты или весь Spike-белок коронавирусов, син-

тезированные в эукариотических системах экспрессии. Все они обладают высокой иммуногенностью и в большей или меньшей степени вызывают выработку вируснейтрализующих антител. Целью настоящей работы было получение на основе синтеза в *E. coli* коротких детерминант Spike-белка SARS-CoV-2 (эпитопов), обладающих нативной конформацией, изучение их иммуногенности и способности образующих в ответ на них антител взаимодействовать с RBD белка и инактивированным вирусом. Успешная реализация данного этапа исследования позволяет перейти к исследованию вируснейтрализующего эффекта получаемых антител, расширению списка изучаемых детерминант и последующим этапам разработки эпитопной вакцины.

Необходимо отметить, что в пределах обеих выбранных детерминант в последовательности RBD Spike-белка находится остаток глутаминовой кислоты E484, который при замене на лизин обеспечивает меньшую эффективность связывания с моноклональными антителами и сыворотками переболевших и вакцинированных [19–21]. Указанная мутация присутствует в новых вариантах вируса SARS-CoV-2, произошедших от линии B.1.1.28, впервые описанных в Бразилии и Японии (P.2 и P.1), а также в штаммах линии B.1.351, также известной как 501Y.V2, впервые выявленных в Южной Африке, а в настоящее время распространенных повсеместно [22]. На основе разработанной в статье платформы технически несложно получить варианты иммуногенных рекомбинантных белков, содержащих замену E484K. Введение в вакцинную композицию обоих вариантов белков должно будет обеспечить выработку антител, связывающихся как с исходными, так и с мутантными вариантами вируса.

Наиболее близкий к предлагаемому в нашей работе подход реализован в исследовании Lu et al. [7], в рамках которого были предсказаны и синтезированы поверхностные В-клеточные эпитопы Spike-белка, созданы вакцины на основе вирусоподобных частиц (VLPs) кор-белка вируса гепатита В (HBV) с применением системы SpyCatcher/SpyTag [7]. Иммуногенность эпитопов проверяли при использовании сывороток мышей через 10 дней после трехкратной иммунизации с двухнедельным интервалом. Для эпитопа S455–469, входящего в состав последовательности D3, и эпитопа S475–499, входящего в состав D2, и D3 (рис. 1), в экспериментах по твердофазному ИФА (ELISA) с использованием пептидов в качестве антигенов показана высокая иммуногенность (титр антител в сыворотках мышей  $> 10^4$ ).

Lu et al. [7] использовали короткие линейные синтетические пептиды, при этом плот-

ность их посадки на вирусоподобные частицы и размер самих частиц, вероятно, больше по сравнению с тримерными гибридными белками, получаемыми в нашей работе. Тем не менее при использовании нашего подхода титр антител в сыворотках мышей также превышает  $10^4$ . В нашем исследовании показана также активность сывороток мышей в отношении RBM и инактивированного вируса, что свидетельствует в пользу нативной конформации полученных нами петлеобразных эпитопов. В работе Lu et al. [7] для эпитопов S455–469 и S475–499 была показана также нейтрализующая активность образующих антител в отношении псевдовирuses вариантов D614 и G614. Это позволяет надеяться на то, что иммунизация белками с эпитопами D2 и D3 также будет приводить к образованию вируснейтрализующих антител в отношении обоих вариантов вирусов.

Таким образом, на основе гибридных белков, включающих Ror-подобный белок из *M. capsulatus* и тримеризационных доменов, альдозазы из *T. maritima* или  $\alpha$ -спирали Spike-белка SARS-CoV-2, создана платформа для получения иммуногенных конструкций, содержащих конформационные эпитопы с непрерывной аминокислотной последовательностью, в частности эпитопы белков вируса SARS-CoV-2, которые могут быть использованы для создания новых вариантов эпитопных вакцин для профилактики COVID-19. Перспективы работы связаны с расширением спектра исследуемых детерми-

нант и характеристикой их способности вызывать образование нейтрализующих антител. Наработка белков микробиологическим синтезом является недорогой альтернативой получения белков синтезом в клетках эукариот. Выбор эпитопов, значительная часть которых экспонируется на поверхности белка, включающих аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие с нейтрализующими антителами и не содержащие сайтов гликозилирования, представляется при этом оптимальной стратегией.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60373\20 «Разработка подходов к созданию профилактической вакцины нового типа против COVID-19, основанной на использовании рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 в составе химерных белковых наночастиц»).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**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](http://www.springer.com/journal/10541)), том 86, вып. 10, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burton, D. R. (2002) Antibodies, viruses and vaccines, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 706–713, doi: 10.1038/nri891.
- Neu, K. E., Henry Dunand, C. J., and Wilson, P. C. (2016) Heads, stalks and everything else: how can antibodies eradicate influenza as a human disease? *Curr. Opin. Immunol.*, **42**, 48–55, doi: 10.1016/j.coi.2016.05.012.
- Sok, D., and Burton, D. R. (2018) Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV, *Nat. Immunol.*, **19**, 1179–1188, doi: 10.1038/s41590-018-0235-7.
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., et al. (2016) Dengue virus serocross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus, *Nat. Immunol.*, **17**, 1102–1108, doi: 10.1038/ni.3515.
- Yuan, M., Liu, H., Wu, N. C., Lee, C. D., Zhu, X., et al. (2020) Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 1119–1123, doi: 10.1126/science.abd2321.
- Xu, K., Acharya, P., Kong, R., Cheng, C., Chuang, G. Y., et al. (2018) Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1, *Nat. Med.*, **24**, 857–867, doi: 10.1038/s41591-018-0042-6.
- Lu, S., Xie, X. X., Zhao, L., Wang, B., Zhu, J., et al. (2021) The immunodominant and neutralization linear epitopes for SARS-CoV-2, *Cell Rep.*, **34**, 108666, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108666.
- Juraja, S. M., Mulhern, T. D., Hudson, P. J., Hattarki, M. K., Carmichael, J. A., and Nuttall, S. D. (2006) Engineering of the *Escherichia coli* Im7 immunity protein as a loop display scaffold, *Protein Eng. Des. Sel.*, **19**, 231–244, doi: 10.1093/protein/gzl005.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.*, **1**, 2856–2860, doi: 10.1038/nprot.2006.468.
- Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Lyaschuk, A. M., Poponova, M. S., Galushkina, Z. M., et al. (2017) Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: purification of protein synthesized in *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1285–1294, doi: 10.1134/S0006297917110062.
- Lee, S.-Y., Kim, C., Ryu, D.-K., Lee, J., Kim, Y.-I., et al. (2020) A novel neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2, *Res. Square*, preprint, doi: 10.21203/rs.3.rs-59639/v1.
- Zuniga, A., Rassek, O., Vrohlings, M., Marrero-Nodarse, A., Moehle, K., et al. (2021) An epitope-specific chemically defined nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus, *Vaccines*, **6**, 85, doi: 10.1038/s41541-021-00347-y.
- Cohen, A. A., Gnanapragasam, P., Lee, Y. E., Hoffman, P. R., Ou, S., et al. (2021) Mosaic nanoparticles elicit cross-

- reactive immune responses to zoonotic coronaviruses in mice, *Science*, **371**, 735–741, doi: 10.1126/science.abf6840.
14. Kang, Y. F., Sun, C., Zhuang, Z., Yuan, R. Y., Zheng, Q., et al. (2021) Rapid Development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates, *ACS Nano*, **15**, 2738–2752, doi: 10.1021/acsnano.0c08379.
  15. Tan, T. K., Rijal, P., Rahikainen, R., Keeble, A. H., Schimanski, L., et al. (2021) A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses, *Nat. Commun.*, **12**, 542, doi: 10.1038/s41467-020-20654-7.
  16. Nguyen, Q. D., Kikuchi, K., Maity, B., and Ueno, T. (2021) The versatile manipulations of self-assembled proteins in vaccine design, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1934, doi: 10.3390/ijms22041934.
  17. Li, J., Ulitzky, L., Silberstein, E., Taylor, D. R., and Viscidi, R. (2013) Immunogenicity and protection efficacy of monomeric and trimeric recombinant SARS coronavirus spike protein subunit vaccine candidates, *Viral Immunol.*, **26**, 126–132, doi: 10.1089/vim.2012.0076.
  18. Tai, W., Zhao, G., Sun, S., Guo, Y., Wang, Y., et al. (2016) A recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV in trimeric form protects human dipeptidyl peptidase 4 (hDPP4) transgenic mice from MERS-CoV infection, *Virology*, **499**, 375–382, doi: 10.1016/j.virol.2016.10.005.
  19. Baum, A., Fulton, B. O., Wloga, E., Copin, R., Pascal, K. E., et al. (2020) Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies, *Science*, **369**, 1014–1018, doi: 10.1126/science.abd0831.
  20. Greaney, A. J., Starr, T. N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Binshtein, E., et al. (2021) Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition, *Cell Host Microbe*, **29**, 44–57.e9, doi: 10.1016/j.chom.2020.11.007.
  21. Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H. D., Starr, T. N., et al. (2021) Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies, *Cell Host Microbe*, **29**, 463–476.e6, doi: 10.1016/j.chom.2021.02.003.
  22. Tegally, H., Wilkinson, E., Lessells, R. J., Giandhari, J., Pillay, S., et al. (2021) Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa, *Nat. Med.*, **27**, 440–446, doi: 10.1038/s41591-021-01255-3.

## DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN COMPONENTS OF EPITOPE VACCINES FOR THE PREVENTION OF COVID-19

A. S. Karyagina<sup>1,2,3\*</sup>, A. V. Gromov<sup>1</sup>, T. M. Grunina<sup>1,2</sup>, A. M. Lyaschuk<sup>1</sup>, A. V. Grishin<sup>1</sup>,  
N. V. Strukova<sup>1</sup>, M. S. Generalova<sup>1</sup>, Z. M. Galushkina<sup>1</sup>, L. A. Soboleva<sup>1</sup>, O. Yu. Dobrinina<sup>1</sup>,  
T. N. Bolshakova<sup>1</sup>, M. E. Subbotina<sup>1,2\*</sup>, E. A. Romanovskaya-Romanko<sup>4</sup>, I. V. Krasilnikov<sup>5</sup>,  
N. B. Polyakov<sup>1,6</sup>, A. I. Solov'yev<sup>1</sup>, D. A. Grumov<sup>1</sup>, V. G. Zhukhovitsky<sup>1</sup>,  
E. I. Ryabova<sup>1</sup>, V. V. Prokofiev<sup>1</sup>, and V. G. Lunin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; e-mail: akaryagina@gmail.com, subbotinam@gmail.com

<sup>2</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 197376 St. Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Saint Petersburg Institute of Vaccines and Sera, FMBA, 198320 St. Petersburg, Russia

<sup>6</sup> Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

A new platform for creating anti-coronavirus epitope vaccines has been developed. From the receptor-binding motif of a Spike protein from SARS-CoV-2 virus, two loop-like epitopes with lengths of 22 and 42 amino acid residues were selected, which implement a large number of protein-protein interactions in complexes with ACE2 and neutralizing antibodies. Two types of hybrid proteins, including one of the two selected epitopes, were constructed. To fix the conformation of the selected epitopes, an approach using protein scaffolds was used. The homologue of Rop protein from *Escherichia coli* ColE1 plasmid, incorporating helix-turn-helix motif, was used as an epitope scaffold for the convergence of C- and N-termini of loop-like epitopes. Loop epitopes were inserted into the turn region. The conformation was additionally fixed by a disulfide bond formed between the cysteine residues present within the epitopes. For the purpose of multimerization, either aldolase from *Thermotoga maritima*, which forms a trimer in solution, or the alpha-helical trimerizer of a Spike protein from SARS-CoV-2, was attached to the epitopes incorporated into the Rop-like protein. To enable purification on heparin-containing sorbents, a short fragment from the heparin-binding hemagglutinin of *Mycobacterium tuberculosis* was inserted at the C-terminus of the hybrid proteins. All the obtained proteins demonstrated a high level of immunogenicity after triplicate parenteral administration to mice. Sera from mice immunized with both aldolase-based hybrid proteins and the Spike protein SARS-CoV-2 trimerizer-based protein with a longer epitope interacted in high titer with both the inactivated SARS-CoV-2 virus and the Spike protein receptor-binding domain.

**Keywords:** SARS-CoV-2, Spike protein, RBD, RBM, epitope vaccine, epitope, epitope scaffold, aldolase, hybrid protein

УДК 577.1

## НЕРЕШЁННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КАРБОАНГИДРАЗ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ ВЫСШИХ СЗ-РАСТЕНИЙ

### Обзор

© 2021 Н.Н. Руденко, Б.Н. Иванов\*

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН Федерального исследовательского центра  
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пушкино,  
Московская обл., Россия; электронная почта: ivboni@rambler.ru*

Поступила в редакцию 06.06.2021

После доработки 09.08.2021

Принята к публикации 09.08.2021

В обзоре представлены современные данные о карбоангидразах, обнаруженных в различных компартментах фотосинтезирующих клеток высших СЗ-растений. Рассмотрены имеющиеся на настоящий момент сведения об уровнях экспрессии генов некоторых из этих карбоангидраз и их зависимости от факторов среды и возраста растения. Проанализированы имеющиеся гипотезы о функциях карбоангидраз плазмалеммы, цитоплазмы, а также стромы и тилакоидов хлоропластов, прежде всего, об участии этих ферментов в подаче молекул углекислого газа рибулозобисфосфаткарбоксилазе (Рубиско). Подробно описаны трудности установления физиологической роли карбоангидраз в клетках растений.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** карбоангидраза, высшие растения, фотосинтез, хлоропласт, тилакоиды.

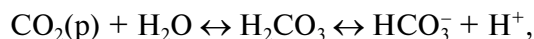
**DOI:** 10.31857/S0320972521100055

### ВВЕДЕНИЕ

Первое упоминание о присутствии в тканях фермента, функционирование которого зависит от  $\text{CO}_2$ , появилось в 1928 году [1]; в 1933 году этот фермент был назван карбоангидразой [2]. После его очистки было обнаружено, что он содержит цинк в активном центре [3]. Карбоангидразы (КА) – одна из немногих, если не единственная группа ферментов, представленная во всех живых организмах, от древних прокариот до млекопитающих. Обнаруженные к настоящему времени КА разделены на 8 семейств на основании консервативных нуклеотидных последовательностей их генов [4–6]; семейства названы буквами греческого алфавита от  $\alpha$  до  $\iota$ . Представители этих семейств не гомологичны, а сами семейства, как полагают, возникали независимо в ходе эволюции [4]. КА разных семейств различаются не только белковой частью,

но и некоторыми структурными элементами реакционного центра [7].

Отнесение ферментов к КА обусловлено тем, что их основная, или единственная, каталитическая активность – катализ реакций гидратации углекислого газа  $\text{CO}_2$  и дегидратации бикарбоната  $\text{HCO}_3^-$ :



где  $\text{CO}_2(\text{p})$  – растворенный углекислый газ. Ферменты значительно увеличивают скорость обеих реакций;  $k_{\text{cat}}$  может быть в миллион раз выше, чем константа спонтанной, не катализируемой реакции, причём в большей степени ускоряется реакция гидратации. Угольная кислота – нестойкое соединение, которое легко распадается на  $\text{CO}_2$  и воду, а в водных растворах диссоциирует в соответствии с  $pK_1$ , равным 6,35; поэтому её часто не включают в уравнения этих реакций.

Сопряжённые формы неорганического углерода (ФНУ),  $\text{CO}_2$  и  $\text{HCO}_3^-$ , создают в водной среде буфер. Данная буферная система неизбежно возникает в клетках организмов, поскольку углекислый газ присутствует в атмосфере Земли (по данным обсерватории Mauna Loa на 01 июля 2021 года его содержание в воздухе состави-

Принятые сокращения: АА – ацетазоламид; ДТ – дикий тип; КА – карбоангидраза; НФХТ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла; Рубиско – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа; ФНУ – формы неорганического углерода; ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2; ФФ – фотофосфорилирование; ЭА – этоксизоламид.

\* Адресат для корреспонденции.

ло 418,17 ppm; <https://keelingcurve.ucsd.edu>). Жизнь на Земле зародилась около 4 млрд лет назад, когда содержание углекислого газа в атмосфере составляло 80%, и воды морей и океанов, находившиеся в равновесии с атмосферой, имели величины рН в диапазоне от трёх до пяти [8]. Реакции клеточного метаболизма требуют оптимальной для этих реакций и устойчивой величины рН, и необходимость присутствия буферной системы и есть, возможно, основная причина, почему ферменты с функцией ускорения интерконверсии бикарбоната и  $\text{CO}_2$  появлялись независимо в разных группах клеточных организмов. КА, появившиеся уже в первых организмах, сыграли не последнюю роль в преобразовании биосферы — считается [9], что во времена доминирования цианобактерий, появившихся 3,8 млрд лет назад, огромные количества  $\text{CO}_2$ , содержащегося в атмосфере в древние геологические эпохи, было поглощено этими организмами за счёт биогенной кальцификации, осуществляемой при участии КА, и отложено в виде строматолитов, слоистых отложений известняка. Возникновение фермента, ускоряющего с целью регулирования обмена протонов при биохимических реакциях взаимопревращение ФНУ и таким образом влияющего на их локальную концентрацию, могло явиться базой для появления клеточных процессов, в которых участвуют ФНУ. В литературе имеется и предположение, что высокая концентрация  $\text{CO}_2$  в древней атмосфере Земли привела к включению различных ФНУ в процессы в организмах и к сопутствующему появлению ферментов, катализирующих взаимопревращение ФНУ [10].

Как пример того, что КА, катализируя быстрый перевод одной ФНУ в другую, выполняет важную функцию, можно привести ситуацию в эритроцитах, где КА в 20 000 раз ускоряет превращение углекислого газа в бикарбонат, покидающий эритроцит в обмен на ионы хлора [11]. Во многом благодаря запросам медицины роль КА в организмах млекопитающих детально изучена, и оказалось, что наличие КА обеспечивает выполнение критических функций в лёгких, крови, почках, глазах и т.д. [12]. Внутри клеток КА играют важную роль в функционировании митохондрий, превращая  $\text{CO}_2$ , образующийся при дыхании, в бикарбонат. Можно отметить, что все КА клеток и тканей позвоночных животных относятся к  $\alpha$ -семейству [4, 12].

Особое значение имеет взаимопревращение ФНУ в автотрофах, которые выполняют на Земле функцию включения неорганического углерода в органические соединения. Для них ФНУ, поступающие из воздуха или воды, являются источником построения самого организма. Прежде

де всего, КА требуются на пути из среды к центрам карбоксилирования, где происходит связывание (фиксация) неорганического углерода в органические соединения, поскольку неоднократно должно происходить взаимопревращение ФНУ для преодоления мембран и водных фаз клеток. Вблизи центров карбоксилирования для обеспечения высокой скорости этого процесса КА нужны для поддержания необходимой локальной концентрации или бикарбоната, или  $\text{CO}_2$  в зависимости от фермента, участвующего в первичной фиксации углерода в высших растениях — рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Рубиско) в С3-растениях или фосфоенолпируват-карбоксилаза (ФЕП-карбоксилаза) в С4-растениях [13].

Огромный прогресс достигнут в понимании деталей участия КА в обеспечении неорганическим углеродом метаболизма простейших фотоавтотрофов, бактерий и зелёных микроводорослей. Для последних показана целая система КА, обслуживающих отдельные этапы поступления ФНУ из среды в клетку. Эти исследования подробно описаны в обзоре Moroney et al. [14]. В нашем обзоре мы представим современные данные о присутствии КА в фотосинтезирующих клетках высших С3-растений, причём особое внимание будет уделено хлоропластам, где протекают основные реакции фотосинтеза. К сожалению, имеется мало доказанных положений, как в этих клетках используется катализ карбоангидразами взаимопревращений ФНУ для достижения физиологически необходимого результата. Будут представлены имеющиеся на этот счёт гипотезы и рассмотрены причины, затрудняющие выяснение функций КА в растениях.

## ВАРЬИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КА В ЛИСТЬЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Первое сообщение о КА-активности в листьях нескольких видов высших растений появилось в 1939 году [15]. Позднее было установлено, что в высших растениях присутствуют КА, относящиеся к трём семействам:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [16]. Присутствие КА трёх семейств может способствовать устойчивому функционированию карбоангидразных систем растения, подвергающегося действию постоянно меняющихся условий внешней среды, т.к. представители нескольких семейств могут иметь более широкий диапазон молекулярных масс, оптимумов рН и возможностей находиться или в составе мембран, или в растворимом состоянии. По современным данным, количество генов, кодирующих КА в клетках высших растений, различается у разных ви-

дов: от четырёх в геноме *Spirodela polyrhiza* до семидесяти девяти — в геноме *Triticum aestivum* [17]. В геноме арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) идентифицировано 19 генов, кодирующих эти ферменты. Названия КА арабидопсиса, используемые далее, даются в соответствии с предложенными в работе Fabre et al. [18]. Авторы нашли, что в листьях арабидопсиса экспрессируются 3 гена  $\alpha$ -семейства, кодирующие  $\alpha$ KA1,  $\alpha$ KA2 и  $\alpha$ KA3. Руденко с соавт. [19] не обнаружили экспрессии последнего, но показали, что листья арабидопсиса содержат транскрипты гена *At4g20990*, кодирующего  $\alpha$ KA4, обнаруженную ранее среди белков тилакоидной мембраны [20]. В листьях арабидопсиса имеется 6 активных генов  $\beta$ ca, и было найдено, что все они экспрессируются [18, 19]; при этом в результате альтернативного сплайсинга экзонов образуется до 17 форм мРНК [21]. Интенсивность экспрессии генов большинства КА  $\beta$ -семейства и содержание соответствующих белков в несколько раз превышает уровень экспрессии генов КА  $\alpha$ -семейства [17].

Хотя субстратами КА являются ФНУ, попытки определить характер изменений уровня транскриптов генов КА в зависимости от содержания  $\text{CO}_2$  в атмосфере не привели к однозначному результату. Fabre et al. [18] показали, что ген *aca2* экспрессировался в листьях арабидопсиса только при пониженном уровне  $\text{CO}_2$ . Wang et al. [21] обнаружили, что профили экспрессии генов  $\beta$ ca то возрастали, то снова снижались через 1, 6, 12, 24 и 48 ч как при повышенном, так и при пониженном содержании  $\text{CO}_2$ . При этом в листьях арабидопсиса интенсивность экспрессии генов всех КА  $\gamma$ -семейства, расположенных в митохондриях, существенно снижалась после четырёх недель при высоком, 2000 ppm, уровне  $\text{CO}_2$  [22]. Неоднозначные и противоречивые данные были получены в ходе многочисленных исследований по определению изменений КА-активности или интенсивности экспрессии генов  $\beta$ ca1,  $\beta$ ca2 и  $\beta$ ca4 в растениях различных видов в зависимости от воздействия таких факторов, как засуха, засоление, холодовой стресс и других. Результаты этих исследований подробно описаны в обзоре Polishchuk [23]. Такая вариабельность экспрессии генов разных КА создаёт трудности для сопоставления уровня экспрессии того или иного гена с предполагаемой функцией белка, кодируемого этим геном.

Причина неоднозначных результатов может состоять в том, что направление изменений уровня экспрессии генов КА под действием стрессовых факторов зависит от продолжительности действия фактора, возраста растения,

длины фотопериода [19]. Продолжительность светового дня более 12 ч способствует переходу арабидопсиса в генеративную фазу, и этот переход сопровождается не только усилением экспрессии тех групп генов, которые ответственны за цветение, но и изменением интенсивности экспрессии многих других генов. В условиях длинного дня (16 ч), которые больше похожи на те условия, в которых эти растения растут в природе, через 3 дня адаптации к высокой интенсивности света происходило возрастание уровня экспрессии большинства генов КА хлоропластов, а непосредственно перед переходом растений к развитию репродуктивных органов содержание транскриптов этих генов снижалось почти до нуля [19]. Возможно, это связано с тем, что КА хлоропластов требуются, прежде всего, в процессах, протекающих в условиях вегетации. Необходимы дополнительные исследования для проверки этого предположения.

## КАРБОАНГИДРАЗЫ ВНЕ ХЛОРОПЛАСТОВ

В высших растениях важная роль КА в процессе фотосинтеза, а именно на стадии первичной фиксации неорганического углерода, надёжно установлена в растениях с С4-типом фотосинтеза. В этих растениях первичное связывание неорганического углерода происходит в цитоплазме клеток мезофилла листа, где углерод в форме бикарбоната присоединяется к молекуле фосфоенолпирувата с участием ФЕП-карбоксилазы [13]. КА цитоплазмы способствуют быстрому переводу в бикарбонат поступающего из воздушной фазы  $\text{CO}_2$ . Мутанты с КА-активностью менее 10% от активности КА растений дикого типа (ДТ) имели сильно подавленный рост и очень низкую скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  при обычной концентрации этого газа в воздухе [24]. Рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа в этих растениях расположена в хлоропластах клеток обкладки сосудистых пучков, где являющийся субстратом этого фермента  $\text{CO}_2$  освобождается при декарбоксилировании соединений, поступающих из клеток мезофилла [13].

Более сложная картина наблюдается в фотосинтезирующих клетках доминирующих на Земле С3-растений, в которых первичная фиксация  $\text{CO}_2$  осуществляется с участием Рубиско, расположенной в хлоропластах клеток мезофилла. Необходимость КА для фотосинтеза С3-растений подтверждалась тем, что этоксизоламид (ЭА), специфический ингибитор КА, способный проникать через биологические мембраны, в концентрациях, когда он не влиял на

фотосинтетический перенос электронов, подавлял  $\text{CO}_2$ -зависимое выделение кислорода в протопластах фотосинтезирующих клеток листьев СЗ-растения гороха [25]. Однако ЭА способен ингибировать активность всех КА фотосинтезирующей клетки, а КА могут играть важную роль не только в непосредственной подаче  $\text{CO}_2$  к Рубиско, но и в обеспечении потока неорганического углерода из воздуха в клетки и внутри клеток — в хлоропласты. Вопрос о том, какие КА и каким образом обеспечивают процесс фотосинтеза в СЗ-растениях, до сих пор остаётся нерешённым.

Уже в плазмалемме фотосинтезирующих клеток расположена КА, наличие которой было обнаружено по проявлению её активности [26–28], а затем показано методом встраивания в геном арабидопсиса гена зелёного флуоресцирующего белка [18]. Wang et al. [29] показали, что в плазмалемме клеток арабидопсиса расположена  $\beta\text{KA4}$ , что она находится там в комплексе с аквапорином PIP2;1. С использованием везикул плазматической мембраны листьев высших растений различных видов также было продемонстрировано, что аквапорины плазмалеммы способствуют транспорту  $\text{CO}_2$ , и что снижение концентрации КА приводит к более низкой проницаемости плазматической мембраны для  $\text{CO}_2$  [30]. Чтобы облегчить переход  $\text{CO}_2$  через плазматическую мембрану, КА должны взаимодействовать с аквапоринами на границах раздела мембрана–жидкая фаза [31]. Исследования, проведённые с использованием методов генетической трансформации, показали, что изменение содержания аквапоринов на единицу площади листьев приводит к изменениям проводимости мезофилла [32]. Инкубация черешков *Populus trichocarpa* в присутствии ингибитора аквапоринов, хлорида ртути, приводила к уменьшению КА-активности на 32% и снижению скорости ассимиляции  $\text{CO}_2$  примерно на 27%, что сопровождалось уменьшением проницаемости мезофилла для  $\text{CO}_2$  [33]. Эти эффекты были обратимы при высоком уровне  $\text{CO}_2$  в атмосфере, т.е. фотосинтез был лимитирован скоростью диффузии  $\text{CO}_2$  при отсутствии эффекта  $\text{HgCl}_2$  на фотохимические процессы в этих растениях. Momauezi и Guu [33] предположили, что  $\text{HgCl}_2$  может подавлять проницаемость мезофилла для  $\text{CO}_2$  как путём ингибирования аквапоринов, так и вследствие подавления активности КА, функционирующей в комплексе с ними. Экспериментальные данные демонстрируют существование функционального взаимодействия аквапоринов и КА в обеспечении проводимости мезофилла для неорганического углерода в листьях

высших растений, и это имеет существенное значение для понимания механизмов проникновения  $\text{CO}_2$  внутрь клеток листа. Однако механизм сопряжения функционирования КА с переносом  $\text{CO}_2$  через клеточные мембраны с участием аквапоринов остаётся неясным, и его выяснение — одна из важных задач будущих исследований. Кроме того, учитывая роль аквапоринов в защитных реакциях растений против биотических и абиотических стрессовых факторов [34], возможно, что функционирующая в комплексе с аквапоринами КА также может участвовать в этих реакциях. Можно предположить, что поведение аквапоринов клеточных мембран как в нормальных, так и в стрессовых условиях зависит от активности КА.

В цитоплазме арабидопсиса были найдены  $\beta\text{KA2}$  и  $\beta\text{KA3}$  [18], а позже и  $\beta\text{KA4}$  [35]. Предполагается, что по градиенту концентрации неорганического углерода, создаваемого в клетке при фиксации  $\text{CO}_2$  внутри хлоропласта, в цитоплазме диффундирует бикарбонат, и цитоплазматические КА нужны для конверсии в него входящего через плазмалемму  $\text{CO}_2$ , а затем для конверсии последнего в  $\text{CO}_2$  перед входом в мембрану оболочки хлоропласта, поскольку липофильные молекулы  $\text{CO}_2$ , как считается, способны легче, чем  $\text{HCO}_3^-$ , проникать через клеточные мембраны [36]. Однако следует принять во внимание, что вход  $\text{CO}_2$  в хлоропласт может обеспечиваться и аквапоринами (см. далее).

В фотосинтезирующих клетках высших СЗ-растений в снабжении хлоропластов неорганическим углеродом могут участвовать и КА митохондрий. В митохондриях СЗ-растений обнаружены 5 КА  $\gamma$ -семейства, образующие сферический домен, являющийся частью комплекса I дыхательной цепи [37]. Кроме того, в матриксе митохондрий арабидопсиса была обнаружена КА  $\beta$ -семейства,  $\beta\text{KA6}$  [18]. Zabaleta et al. [38] предположили, что домен из пяти КА способствует образованию из  $\text{CO}_2$  бикарбоната с последующим его переносом из митохондрий в хлоропласты. Эта экспортная система, как показано в работе Riazunnisa et al. [39], может быть особенно важна в условиях, способствующих интенсификации фотодыхания. В этом процессе при недостатке  $\text{CO}_2$  вследствие оксигеназной активности Рубиско в хлоропластах образуется гликолевая кислота, поступающая в пероксисомы, в которых из неё образуется глицин, возвращающийся затем в митохондрии, где при декарбоксилировании в процессе конденсации двух молекул глицина выделяется  $\text{CO}_2$ . Что касается механизма направленной транспортировки неорганического углерода из митохондрий в хлоропласты, то можно предположить существование

специфического взаимодействия поверхностей этих органелл, поскольку их часто находят в клетке в контакте друг с другом. Однако пока данная проблема остаётся нерешённой.

### КАРБОАНГИДРАЗА ОБОЛОЧКИ ХЛОРОПЛАСТА

Аквапорины в клетках высших растений присутствуют не только в плазмалемме, но также во внутренней мембране оболочки хлоропластов [40]. Было обнаружено, что мутанты с нокаутированным геном, кодирующим аквапорин AtP1P1;2, обладали сниженной проницаемостью хлоропластов для  $\text{CO}_2$  [41, 42]. Perez-Martin et al. [43] на основе данных об одностороннем изменении интенсивности экспрессии генов, кодирующих аквапорины оболочки хлоропластов и КА в листьях растений *Olea europaea*, при изменении влажности пришли к выводу, что эти белки могут функционировать совместно, осуществляя поставку  $\text{CO}_2$  в строму хлоропластов. Авторы при этом предполагали участие в этом процессе растворимой КА стромы.

При изучении диффузии  $\text{H}_2\text{O}_2$  как участника ретроградного сигналинга было показано, что  $\text{H}_2\text{O}_2$ , продуцируемая внутри хлоропластов, диффундирует в цитоплазму через каналы, образованные в оболочке хлоропластов аквапоринами, и что ингибитор КА ацетазоламид (АА) существенно подавляет эту диффузию [44]. Поскольку АА ингибировал и КА-активность оболочки хлоропласта, в этой работе было предположено, что ингибирующий эффект АА на проницаемость аквапоринов оболочки хлоропластов является, по крайней мере частично, результатом действия АА на КА, связанную с аквапоринами, подобно  $\beta\text{KA4}$  в мембране плазмалеммы (см. выше). Таким образом, возможно, что в оболочке хлоропластов содержится КА, которую ещё предстоит идентифицировать.

### КАРБОАНГИДРАЗЫ СТРОМЫ ХЛОРОПЛАСТОВ

На свету, т.е. в условиях, когда возможен фотосинтез, рН стромы хлоропласта, где в С3-растениях расположена Рубиско, становится слабощелочным, достигая величин 7,7–8,0 [45], при которых концентрация  $\text{HCO}_3^-$  в строме возрастает до 350–700 мкМ, по сравнению с 70 мкМ в темноте при рН 7,0, температуре 20 °С и содержании в воздухе 0,04%  $\text{CO}_2$ . Таким образом, при «световых» величинах рН стромы более 95% не-

органического углерода находится в форме  $\text{HCO}_3^-$  и, чтобы обеспечить наблюдаемые *in vivo* высокие скорости фиксации  $\text{CO}_2$ , требуются высокие скорости конверсии  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_2$ , которых нельзя достичь в спонтанной реакции. Представлялось очевидным, что какая-то КА должна участвовать в такой конверсии и подаче  $\text{CO}_2$  к Рубиско, но проблема участия КА в этом процессе до сих пор остаётся предметом исследований и гипотез.

В строме хлоропластов присутствует КА, содержание которой в среднем составляет 1–20% от общего белка листьев [46] и которая является вторым по содержанию белком листьев после Рубиско. Эта КА в листьях арабидопсиса была идентифицирована как продукт гена *At3g01500* и названа  $\beta\text{KA1}$  [18]. Позже стромальные КА  $\beta$ -семейства листьев высших растений других видов стали также называть  $\beta\text{KA1}$  [29, 43].

Трансформация растений табака антисмысловыми конструктами гена стромальной КА приводила к уменьшению её содержания до 1–2% от уровня в ДТ, но существенных изменений скорости фотосинтеза, активности Рубиско, содержания хлорофилла и проводимости устьиц не наблюдалось; при этом, однако, в мутантных растениях происходило снижение парциального давления  $\text{CO}_2$  в сайтах карбоксилирования [47]. Можно отметить, что остававшиеся 1–2% КА стромы — довольно существенная величина, учитывая большое содержание этого фермента и его высокую ферментативную активность. В работе Ferreira et al. [48] было показано, что растения арабидопсиса с нокаутированным геном, кодирующим стромальную  $\beta\text{KA1}$ , демонстрировали более низкую, чем растения ДТ, выживаемость, но последняя могла быть восстановлена либо введением сахарозы в питательную среду, либо увеличением содержания  $\text{CO}_2$  в воздухе во время выращивания. Хотя у  $\beta\text{KA1}$ -дефицитных проростков была снижена способность к светозависимой скорости ассимиляции  $\text{CO}_2$ , развитие первых настоящих листьев замедлено, выжившие зрелые растения  $\beta\text{KA1}$ -дефицитных мутантов не проявляли фенотипических отличий от растений ДТ. Это рассматривалось как свидетельство неспособности  $\beta\text{KA1}$  участвовать в фотосинтезе в зрелых листьях [48].

С другой стороны, был обнаружен ряд свидетельств функциональной и структурной связи стромальной  $\beta\text{KA}$  и Рубиско. Перенос растений гороха, выращенных при концентрации  $\text{CO}_2$  1000 ppm, в условия нормального содержания  $\text{CO}_2$  в атмосфере приводил к быстрому увеличению содержания РНК генов и КА, и Рубиско,

после чего активность соответствующих ферментов в листьях увеличивалась [49]. Эксперименты по иммуноцитолокализации показали, что в строме хлоропластов листьев гороха растворимая  $\beta$ КА расположена вблизи Рубиско [50]. КА, аналогичная  $\beta$ КА1 арабидопсиса, была идентифицирована в растениях *Brassica napus* с помощью масс-спектрометрического анализа как белок, взаимодействующий с изоформами большой субъединицы Рубиско [51].

Противоречие экспериментальных данных о роли  $\beta$ КА1 в фотосинтезе — возможно, следствие участия не только этой стромальной КА в снабжении  $\text{CO}_2$  Рубиско. В строме хлоропластов обнаружена ещё одна КА,  $\alpha$ КА1 [52]. Снижение ряда показателей фотосинтетической активности растений с нокаутом гена, кодирующего  $\alpha$ КА1, а также способности накапливать крахмал [53], позволяет предполагать участие  $\alpha$ КА1 в фотосинтезе и то, что эта КА играет важную роль в поставках  $\text{CO}_2$  к Рубиско.

С использованием праймеров, комплементарных двум формам альтернативного сплайсинга матричной РНК гена *At3g01500*, кодирующего  $\beta$ КА1,  *$\beta$ cal1a* и  *$\beta$ cal1b*, в листьях арабидопсиса были обнаружены различия в интенсивности экспрессии этих форм при увеличении интенсивности света, а именно: увеличение содержания транскриптов формы  *$\beta$ cal1b* и уменьшение  *$\beta$ cal1a* [19]. Обнаруженное при этом увеличение экспрессии при повышенном освещении также гена *aca1* позволило авторам предположить совместное участие  $\alpha$ КА1 и  $\beta$ КА1b в поставке  $\text{CO}_2$  Рубиско. Возможно,  $\beta$ КА1 не является непосредственным поставщиком  $\text{CO}_2$  для реакции карбоксилирования, а выполняет какую-то важную, но вспомогательную функцию. Например, высокоэкспрессируемая форма  *$\beta$ cal1b* кодирует КА, выполняющую роль ускорителя преобразования поступающего в хлоропласт  $\text{CO}_2$  в бикарбонат, чтобы увеличить концентрацию последнего во всем объёме стромы в соответствии с величиной рН и сделать его доступным для КА, которая непосредственно снабжает Рубиско  $\text{CO}_2$ . Если только одна из форм  $\beta$ КА1 совместно с  $\alpha$ КА1 участвует в подаче  $\text{CO}_2$  Рубиско, то важно выяснить функциональную значимость процессов, в которых участвует другая форма этой КА.

### КАРБОАНГИДРАЗЫ ТИЛАКОИДОВ ХЛОРОПЛАСТОВ И ИХ ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ

Одной из первых работ, продемонстрировавших, что в хлоропластах высшего СЗ-растения

гороха имеются КА, расположенные в тилакоидной мембране, была работа Комаровой с соавт., опубликованная в 1982 году в журнале «Биохимия» [54]. Это было подтверждено в целом ряде исследований, где было показано, что КА имеются в тилакоидных мембранах и С4-растений, и водорослей [55]. Более того, оказалось, что в тилакоидах находится несколько КА [56, 57]. Известно, что для обеспечения переноса электронов на акцепторной стороне фотосистемы 2 (ФС2) необходимо присутствие одного из компонентов КА-реакции, бикарбоната [58], взаимодействие которого с негемовым железом обеспечивает быстрый перенос электронов от  $Q_A$  на  $Q_B$  [59]. После электрофореза фрагментов тилакоидных мембран, обогащённых ФС2 (ФС2-мембран), из гороха и арабидопсиса КА-активность была обнаружена в областях геля, содержащих как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные белки, причём последние относились к коровому комплексу ФС2 [56, 60, 61]. КА-активность присутствовала и в элюатах этих зон [62]. Было предположено [55], что именно КА-активность, обнаруженная в высокомолекулярной фракции, управляет поставкой бикарбоната акцепторной стороне ФС2. При этом результаты работ Руденко с соавт. [56], Khristin et al. [60] и Ignatova et al. [61] могут быть интерпретированы как свидетельствующие, что эта активность — не результат присутствия фермента КА, а следствие наличия специфической структуры в составе корового комплекса ФС2, т.е. высокомолекулярный носитель КА-активности — не отдельный белок, а конструкция из аминокислот соседствующих белков, у которых активный центр образован аминокислотами разных белковых субъединиц, как в КА  $\gamma$ -семейства. Вопрос о наличии КА-активности на акцепторной стороне ФС2 требует дальнейшего изучения, учитывая его принципиальную важность для понимания регуляции фотосинтетического электронного транспорта.

Ингибирующий эффект на активность ФС2 известных ингибиторов КА, АА и ЭА, был обнаружен давно и связывался с действием на донорную сторону ФС2 [63]. Позже, однако, было установлено, что этот эффект обусловлен, по крайней мере частично, их способностью неспецифически подавлять перенос электронов в ФС2 [64, 65]. Недавно было найдено, что другой ингибитор КА сульфонамидной природы, трифторметансульфонамид, снижает фотосинтетическое выделение кислорода, специфически ингибируя КА-активность ФС2-мембран [66].

То, что для эффективного переноса электронов не только на акцепторной, но и на донорной

стороне ФС2 необходим бикарбонат, было обнаружено в работах Klimov et al. [67, 68], и авторы предположили наличие здесь КА, которая участвует в его поставке. Недавно в тилакоидных мембранах арабидопсиса вблизи комплекса ФС2 найдена КА, которая была идентифицирована как  $\alpha$ КА4, кодируемая геном *At4g20990*; именно она оказалась низкомолекулярным источником КА-активности в ФС2-мембранах [69]. Присутствие  $\alpha$ КА4 в тилакоидах было ранее установлено путём протеомного анализа [20].

КА-активность была обнаружена также во фрагментах тилакоидных мембран, обогащённых фотосистемой 1 (ФС1) – ФС1-мембранах, происходящих из стромальных тилакоидных мембран, т.е. мембран, не входящих в грани [70]. Влияние ингибиторов и детергентов на КА-активность ФС1-мембран отличалось от влияния на КА-активность ФС2-мембран, и при выделении белков-носителей этой активности из ФС1- и ФС2-мембран обнаружилось различие их молекулярных масс [61]. КА-активность ФС1-мембран была одинаково чувствительна как к плохо проникающему в мембраны АА, так и к липорастворимому ЭА [61, 62], что указывало на расположение носителя КА-активности на стромальной поверхности тилакоидной мембраны, где она доступна обоим ингибиторам. С помощью масс-спектрального анализа установлено присутствие в стромальных тилакоидных мембранах арабидопсиса карбоангидразы  $\alpha$ КА5 [71].

Помимо тилакоидных мембран, КА-активность найдена в тилакоидном люмене хлоропластов гороха и арабидопсиса [57, 72]. Эта активность по целому ряду характеристик отличалась от активности тилакоидных мембран, и было доказано, что её носителем служит растворимый белок [72]. Эту КА по целому ряду свойств удалось идентифицировать как КА  $\beta$ -семейства. Заманчиво предположить, что это –  $\beta$ КА5, которая была определена, как расположенная в хлоропластах [18]. Уровень экспрессии гена *At4g33580*, кодирующего  $\beta$ КА5, на 2–3 порядка ниже, чем гена *At3g01500*, кодирующего стромальную  $\beta$ КА1, однако нокаут по гену *At4g33580* приводит к значительному отставанию растений в росте (Дж. Морони, личное сообщение). К настоящему моменту  $\beta$ КА5 является единственной КА, отсутствие которой приводит к значительным изменениям в фенотипе арабидопсиса при нормальных условиях вегетации.

**Физиологическое значение КА-активностей тилакоидов.** Роль этих активностей в метаболизме хлоропласта остаётся пока не выясненной полностью. Имеются более или менее обоснованные

предположения, причём часто не одно, об их функциональной роли. Например, помимо функции регулятора подачи бикарбоната к негемовому железу, расположенному между  $Q_A$  и  $Q_B$  (см. выше), КА-активности на акцепторной стороне ФС2 была приписана функция подачи протонов для протонирования пластохинона в сайте  $Q_B$  при превращении его в пластогидрохинон [73].

В ряде случаев вывод о функции КА делается на основании эффектов нокаута соответствующих генов. Было обнаружено, что в мутанте с отсутствующим синтезом  $\alpha$ КА4 в определенных условиях уменьшена по сравнению с ДТ энергозависимая часть нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (НФХТ) [74–77]. Эта часть НФХТ зависит от поступления протонов к белку PsbS, находящемуся в тесной связи со светособирающим комплексом ФС2, что позволило сделать вывод, что данная КА, располагаясь в мембране на её люменальной стороне, участвует в этом процессе как поставщик протонов, освобождающихся при гидратации  $CO_2$ . Мутанты арабидопсиса, в которых отсутствовала  $\alpha$ КА4, были менее устойчивы к фотоингибированию по сравнению с растениями ДТ [75], что подтверждало участие этой КА в развитии НФХТ, предохраняющего ФС2 от фотоингибирования.

Тилакоидной КА, ориентированной в люмен и расположенной вблизи донорной стороны ФС2, приписывается и роль в ускорении дегидратационной реакции, т.е. связывания бикарбоната с протонами, появляющимися здесь в результате окисления воды. Поскольку локальное подкисление вблизи водоокисляющего комплекса ФС2, возрастающее при увеличении скорости освобождения протонов при повышении интенсивности света, может вызывать повреждение этого комплекса [78], удаление протонов способно устранить данную причину фотоингибирования ФС2. В зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* указанная роль была предположена для карбоангидразы САНЗ, связанной с тилакоидной мембраной на люменальной стороне [79]. Были получены убедительные свидетельства в пользу такой её физиологической роли: отсутствие этой КА сопровождалось снижением устойчивости водоросли к действию света высокой интенсивности [80] и при увеличении рН среды [10, 81]. Данные, полученные в работе, проведённой с использованием препаратов ФС2-мембран, выделенных из шпината [82], показали, что  $HCO_3^-$  на донорной стороне ФС2 действительно функционирует как мобильный акцептор протонов, появляющихся в результате окисления воды.

Таким образом, две разные гипотезы о роли КА на люменальной стороне ФС2 предполагают её участие в защите от фотоингибирования. Возможно, функционирование здесь КА создаёт условия для обоих процессов. В работе Rudenko et al. [76] представлена гипотетическая схема, согласно которой  $\alpha$ КА4 арабидопсиса, располагаясь вблизи светособирающего комплекса ФС2, направлено подаёт протоны, возникающие при гидратации  $\text{CO}_2$  белкам, ответственным за развитие НФХТ, с одновременным высвобождением в той же реакции бикарбоната, который связывает протоны, возникающие при окислении воды в водоокисляющем комплексе ФС2, расположенном рядом.

Характеристики фотосинтеза мутанта с выключенным геном, кодирующим  $\alpha$ КА2, были исследованы параллельно таковым мутанта с выключенным геном, кодирующим  $\alpha$ КА4. Эффекты выключения этих генов на светоиндуцированное накопление перекиси водорода, содержание крахмала, эффективный квантовый выход ФС2, НФХТ и скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  в одинаковых условиях эксперимента оказались разнонаправленными относительно растений ДТ [75]. Такое противоположное влияние на характеристики фотосинтеза нокаутных генов, кодирующих  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, позволило предположить, что  $\alpha$ КА2, как и  $\alpha$ КА4, расположена в тилакоидной мембране. Тот факт, что в мутантах по  $\alpha$ КА2, НФХТ возрастало относительно величины в ДТ за счёт энергозависимого компонента, предполагал, что в ДТ данная КА как-то регулирует удаление протонов, участвующих в развитии этого тушения. В растениях ДТ уровень экспрессии гена, кодирующего  $\alpha$ КА2, повышался при выращивании растений при высокой интенсивности света в условиях короткого дня [19], что, возможно, отражает необходимость этой КА для удаления избытка протонов в светособирающем комплексе, где развивается НФХТ.

В работе Zhurikova et al. [75] было предположено, что  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, регулируя, соответственно, подачу и удаление протонов, создают такую их концентрацию, которая обеспечивает развитие НФХТ, необходимого в данных условиях. Это может достигаться катализом на свету реакций гидратации  $\text{CO}_2$  и дегидратации бикарбоната, при которых, соответственно, высвобождаются и связываются протоны. Это предполагает расположение этих КА на противоположных сторонах тилакоидной мембраны, поскольку направление КА-реакции определяется величиной рН и/или концентрацией ФНУ, которые могут различаться в компартментах, разделённых мембраной. Если верно предположе-

ние, что  $\alpha$ КА4 подаёт протоны, располагаясь в мембране ближе к люмену (см. выше), то  $\alpha$ КА2, регулирующая удаление протонов, должна располагаться на стромальной стороне тилакоидной мембраны. Поскольку светособирающий комплекс ФС2 расположен в основном в гранальных тилакоидах, возможно, и  $\alpha$ КА2 располагается там. Однако пока не выявлена КА-активность, которую можно связать с присутствием этой КА.

Одна из перспективных идей в решении проблемы конверсии бикарбоната в  $\text{CO}_2$  и подачи последнего Рубиско — предположение об участии в этом процессе тилакоидных КА. Чтобы быть «донором»  $\text{CO}_2$ , КА, катализируя дегидратацию бикарбоната, должна располагаться в непосредственной близости от сосредоточенной в строме хлоропласта Рубиско, т.к. молекулы  $\text{CO}_2$ , оказавшись в слабощелочной среде стромы, сразу же превращались бы обратно в бикарбонат. По этой причине в поставке  $\text{CO}_2$  Рубиско не могут участвовать КА, расположенные вблизи ФС2 в гранальных мембранах. Скорее всего, такую поставку могут осуществлять КА, расположенные вблизи ФС1, поскольку эта фотосистема находится в стромальных тилакоидах, на стромальной поверхности которых в составе мультиферментных комплексов может располагаться часть Рубиско [83, 84]. В этих тилакоидах, как указано выше, была найдена  $\alpha$ КА5.

Участие КА, расположенной на стромальной поверхности стромальных тилакоидных мембран, в конверсии бикарбоната в  $\text{CO}_2$  и подаче его Рубиско — гипотеза, но протекание дегидратации бикарбоната именно здесь, возможно, проявляется в обнаруженной ещё в 1964 году [85] стимуляции бикарбонатом фотофосфорилирования (ФФ) в тилакоидах. Подорванов с соавт. [86] и Онойко с соавт. [87] обнаружили, что ингибиторы КА, АА и ЭА устраняли эффект стимуляции ФФ бикарбонатом, но, как уже упоминалось, эти ингибиторы подавляют и перенос электронов. Было, однако, найдено, что добавление в суспензию тилакоидов гидрофильного ингибитора КА, мафенида, в концентрации, не оказывающей ингибирующего влияния на перенос электронов, также значительно снижало стимуляцию ФФ [65]. Выдвинуто предположение [71], что дегидратация бикарбоната с участием  $\alpha$ КА5 приводит к стимуляции ФФ вследствие возрастания рН на мембране: в реакции дегидратации бикарбоната связываются протоны, что уменьшает их концентрацию на поверхности мембраны, в то время как часть образовавшихся молекул  $\text{CO}_2$  проникает через мембрану из примембранного слоя [88] в люмен

тилакоида, где гидратация молекул  $\text{CO}_2$  с помощью люминальной КА приводит к увеличению концентрации протонов. Важно, что это происходит в стромальных тилакоидах, где расположена АТФ-синтаза. Очевидно, однако, что *in vivo* большая часть молекул  $\text{CO}_2$ , образовавшихся при дегидратации бикарбоната на поверхности мембраны, должны направляться в строму хлоропластов. Как указано выше, помимо фермента, растворенного в строме, имеется Рубиско на поверхности мембран [83, 84], и молекулы  $\text{CO}_2$ , образовавшиеся с участием  $\alpha\text{КА5}$ , могут перехватываться именно этой Рубиско. По некоторым данным [89], Рубиско может связываться с мембраной через АТФ-синтазу, которая расположена в тех же стромальных мембранах, что и  $\alpha\text{КА5}$ . В работе Anderson и Carol [50] было оценено, что около 60% Рубиско связано с тилакоидными мембранами.

Можно отметить, что показана связь Рубиско с КА в составе контактирующего с тилакоидной мембраной супрамолекулярного комплекса, хотя авторы рассматривали только растворимую КА стромы [90]. Возникает интересная проблема, которую важно выяснить в будущих исследованиях, — не существует ли комплекс  $\alpha\text{КА5}$  и Рубиско.

### ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ФУНКЦИЙ КАРБОАНГИДРАЗ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Экспериментальные результаты предполагают, что КА в фотосинтезирующих клетках СЗ-растений катализируют реакции, обеспечивающие или поставку, или удаление в определенном месте того продукта реакции (протона, бикарбоната или  $\text{CO}_2$ ), который необходим для осуществления важного для метаболизма клетки процесса. Особенностью, затрудняющей выявление участия в таком процессе той или иной КА растительных клеток, является то, что необходимый результат может обеспечиваться совместным функционированием нескольких КА. Это функционирование может быть параллельным или сопряженным.

Как свидетельство в пользу возможного параллельного выполнения несколькими КА одной и той же функции, можно рассматривать данные о том, что экспрессия гена, кодирующего цитоплазматическую  $\beta\text{КА2}$ , через две недели после повышения освещенности растений арабидопсиса становилась выше, а гена, кодирующего другую цитоплазматическую КА,  $\beta\text{КА3}$ , — ниже [19]. Вероятно, степень участия этих КА в

метаболических процессах в цитоплазме изменяется в зависимости от внешних условий, диктующих, какая КА становится ведущей в обеспечении протекания этих процессов. Иллюстрацией такой ситуации может также служить доказанное изменение в зависимости от условий участия двух КА водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, САН1 и САН2, в поставке неорганического углерода в клетку: САН1 индуцируется низкими концентрациями  $\text{CO}_2$  в окружающей среде, а САН2 — высокими [16].

Предположенное нами на основе имеющихся данных (см. выше) участие в преобразовании  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_2$  в строме хлоропластов нескольких растворимых КА параллельно с ориентированными в строму тилакоидными КА также вполне возможно и представляется даже необходимым. Это способствовало бы повышению надёжности системы и её способности к адаптации при изменении условий среды с целью обеспечения оптимальной скорости подачи  $\text{CO}_2$  центрам карбоксилирования, т.е. обеспечения стабильного протекания важнейшего физиологического процесса в растениях. Решение этой проблемы, по нашему мнению, является приоритетным для выяснения роли КА в фотосинтезе.

Функционирование нескольких КА, которое можно назвать сопряженным, иллюстрируется деятельностью  $\beta\text{КА1}$  и  $\beta\text{КА4}$ , которые расположены, соответственно, в строме и плазматической мембране и которые, как было установлено [91, 92], совместно регулируют устьичную проводимость. О сопряженном функционировании двух КА свидетельствует и факт того, что выключение синтеза только сразу двух цитоплазматических КА,  $\beta\text{КА2}$  и  $\beta\text{КА4}$ , приводило к существенному подавлению роста мутантов при выращивании в условиях пониженного содержания  $\text{CO}_2$  [35]; это указывало на их совместное участие в поступлении неорганического углерода в клетку.

Сопряженное функционирование КА в фотосинтезирующих клетках высших растений подразумевает то, что эти ферменты действуют в кооперации для достижения необходимого физиологического результата. Выше описана гипотетическая возможность такого функционирования  $\alpha\text{КА4}$  и  $\alpha\text{КА2}$ . Основанием для данного предположения явилось противоположное направление изменений уровня экспрессии генов *aca4* и *aca2* при увеличении освещенности в условиях «длинного» дня [19] — предполагается, что изменение соотношения содержания этих белков может обеспечить тот баланс их функционирования, который необходим для достижения нужной величины НФХТ в тех или иных

физиологических условиях. Необходимо, однако, подчеркнуть, что использование оценки уровней экспрессии генов для установления функций КА, которые эти гены кодируют, требует осторожности, поскольку уровень экспрессии генов не всегда можно сопоставлять с количеством соответствующих белков, и предложенная гипотеза, очевидно, требует дополнительной проверки.

Фундаментальное значение имеет вопрос о специфических механизмах функционирования тех КА, которые связаны с мембранами клеток. Вследствие расположения активного центра таких КА на поверхности мембраны продукты катализируемых ими реакций попадают в примембранные неперемешиваемые слои, где их стационарная концентрация может значительно возрастать по сравнению с концентрацией в кон-

Расположение и предполагаемые функции карбоангидраз, обнаруженных в фотосинтезирующих клетках С3-растений (с приведением источника данных)

| Клеточная структура   | Карбоангидраза                                                                                                | Предполагаемые функции                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Плазмалемма           | βКА4 [18, 29]                                                                                                 | в комплексе с аквапорином облегчает поступление CO <sub>2</sub> через плазматическую мембрану в клетки [30, 32, 33]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Цитоплазма            | βКА2 [18]<br>βКА3 [18]<br>βКА4 [35]                                                                           | функционируя совместно, преобразуют поступающий в цитоплазму CO <sub>2</sub> в HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , а затем переводят последний обратно в CO <sub>2</sub> перед входом в мембрану оболочки хлоропласта                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Митохондрии           | βКА6 [18] в матриксе;<br>5 γКА в составе сферического домена, связанного с комплексом I дыхательной цепи [37] | домен из пяти γКА и βКА6 участвуют в образовании бикарбоната из CO <sub>2</sub> и формируют систему транспорта бикарбоната из митохондрий в хлоропласты [37, 38]; эта система особенно важна при недостатке CO <sub>2</sub> в воздухе, когда в фотосинтезирующих клетках стимулируется фотодыхание [22, 39]                                                                                                                                                                                         |
| Оболочка хлоропластов | ?                                                                                                             | в комплексе с аквапоринами способствует выходу из стромы в цитоплазму H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , продуцируемой внутри хлоропластов [44]; участвует в преобразовании HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> цитоплазмы в CO <sub>2</sub> и в комплексе с аквапоринами, расположенными в оболочке хлоропластов, облегчает поставку CO <sub>2</sub> в строму (данная работа)                                                                                                                               |
| Строма хлоропластов   | βКА1 [18]<br>αКА1 [52]                                                                                        | обе участвуют в преобразовании HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> стромы в CO <sub>2</sub> для обеспечения им Рубиско [94], функционируя последовательно или параллельно [19, данная статья]; βКА1 совместно с плазмалеммой βКА4 в замыкающих клетках устьиц участвует в регуляции размера устьичной щели, т.е. газообмена между воздухом и апопластом [91]; βКА1 участвует в процессах защиты от стрессов [6, 23], что частично может быть связано с её способностью связывать салициловую кислоту [95] |
| Тилакоидные мембраны  | αКА4 [69] вблизи ФС2 на люменальной стороне мембраны                                                          | защищает от фотоингибирования двумя путями:<br>1. поставляет бикарбонат для связывания протонов, освобождающихся в результате окисления воды при освещении [76];<br>2. участвует в развитии НФХТ как поставщик протонов, освобождающихся при гидратации CO <sub>2</sub> , белку PsbS [75, 76]                                                                                                                                                                                                       |
|                       | αКА5 вблизи ФС1 на стромальной поверхности стромальных мембран [71]                                           | участвует в стимуляции ФФ при увеличении концентрации бикарбоната в строме хлоропласта [65, 71]; благодаря расположению на стромальной поверхности стромальных мембран участвует в конверсии бикарбоната в CO <sub>2</sub> и подаче последнего мембрано-связанной Рубиско (данная работа)                                                                                                                                                                                                           |
|                       | αКА2 (?) [75]                                                                                                 | удаление избытка протонов из люмена при их накоплении в условиях ограничения функционирования цикла Кальвина [75]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Люмен                 | βКА5 (?) [57, 72]                                                                                             | регуляция pH для защиты белков люмена при быстрых изменениях интенсивности света [57]; обеспечение с участием CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -буфера облегчённой диффузии протонов к каналу АТФ-синтазы [87]                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Примечание. Названия указаны в соответствии с номенклатурой, предложенной в ранее опубликованной работе [18].

тактирующей с мембраной водной фазе. Если вблизи мембраносвязанных КА расположены другие мембраносвязанные ферменты (например, Рубиско), которые используют в качестве субстрата продукты КА-реакции, то для таких ферментов создаются условия существенного увеличения скорости катализируемых ими реакций. Важный и практически неисследованный вопрос — в какой степени данное обстоятельство определяет функцию мембраносвязанных КА.

В связи с выяснением функций мембраносвязанных КА возникает также вопрос: участвуют ли КА фотосинтезирующих клеток в формировании трансмембранных каналов? Известно, что в клетках животных КА, хотя не сами по себе, формируют эти каналы, но функционируют в комплексе с трансмембранными каналами, сформированными другими белками [93]. Выше были представлены данные, которые показывают существование такой связи и в клетках растений, а именно связи КА с каналами, формируемыми аквапоринами как в плазмалемме, так и оболочке хлоропласта. В частности, показано [42], что в мутанте арабидопсиса по аквапоринам проницаемость оболочки хлоропласта для  $\text{CO}_2$  в 2 раза меньше, чем в ДТ. Можно, например, предполагать, что описанные выше эффекты нокаута гена, кодирующего  $\alpha\text{KA2}$  [74, 75], обусловлены тем, что эта КА регулирует проводимость канала выхода протонов из тилакоидов. Молекулярные механизмы возможного участия КА в функционировании каналов, в частности в обеспечении транспорта продуктов катализируемой ими реакции, однако, не выявлены. Проблемы при исследовании этих механизмов возникают, в частности из-за того, что трудно бывает разделить действие применяемых ингибиторов на КА и собственно на проводимость каналов.

Таким образом, основные трудности изучения функций конкретных КА в фотосинтезирующих клетках высших растений обусловлены тем, что в одном компартменте может присутствовать несколько ферментов, действующих совместно. Ингибиторный анализ оказывается бесполезным, поскольку специфические ингибиторы подавляют активность всех КА. В свою очередь, нокаут гена одной из КА при параллельном выполнении несколькими КА какой-то функции может не привести к угнетению данной функции, а при сопряжённом участии КА в обеспечении какого-то процесса или необходимой локальной концентрации продуктов карбоангидразной реакции такой нокаут, хотя и мо-

жет проявиться в изменении или протекания исследуемого процесса или этих концентраций, не позволяет без дополнительных исследований выяснить механизм действия данной КА.

В ранее опубликованных работах [35, 48, 76, 91] отсутствие тех или иных КА в соответствующих одиночных мутантах не показало в нормальных благоприятных условиях существенных отличий от растений ДТ, и эти отличия обнаруживались только после помещения растений в стрессовые условия. Это также создаёт трудности выявления функций КА, поскольку показывает, что отсутствие такого фермента как КА может не проявляться в оптимальных условиях жизни растения и может стать заметным или при резком изменении интенсивности света, или содержания одной из ФНУ, например  $\text{CO}_2$  при изменении внешних условий или протонов при нарушении проницаемости мембран. Это может быть свидетельством участия КА в защите растений от влияния неблагоприятных условий. Нарушение метаболизма при благоприятных условиях наблюдали только у двойных мутантов по КА [35, 91]. Поэтому полезным для выявления функций КА и наличия системы этих ферментов может быть использование двойных или даже тройных мутантов.

В таблице представлены имеющиеся в настоящее время данные о КА, идентифицированных в структурах фотосинтезирующих клеток СЗ-растений, и их предполагаемых функциях. Знаки вопроса поставлены: 1) когда носитель КА-активности, выявленной в оболочке хлоропласта, еще не идентифицирован, 2) по причине отсутствия окончательных доказательств нахождения  $\alpha\text{KA2}$  в тилакоидной мембране, 3) а также вследствие весьма предварительного отождествления обнаруженной люменальной КА с  $\beta\text{KA5}$ . Указаны только основные предполагаемые функции выявленных КА и обнаруженных КА-активностей.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной научной программы (тема № 121040500121-3).

**Благодарности.** Авторы благодарят к.б.н. М.А. Козулеву за полезные дискуссии по теме при подготовке обзора.

**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

- Henriques, O. M. (1928) Die Bindungsweise des Kohlendioxyds im Blute, *Biochem. Z.*, **200**, 1-24.
- Meldrum, N. U., and Roughton, F. J. W. (1933) Carbonic anhydrase. Its preparation and properties, *J. Physiol.*, **80**, 113-142, doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp003077.
- Keilin, D., and Mann, T. (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme, *Biochem. J.*, **34**, 1163-1176, doi: 10.1042/bj0341163.
- Hewett-Emmett, D., and Tashian, R. E. (1996) Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5**, 50-77, doi: 10.1006/mpev.1996.0006.
- DiMario, R. J., Machingura, M. C., Waldrop, G. L., and Moroney, J. V. (2018) The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms, *Plant Sci.*, **268**, 11-17, doi: 10.1016/j.plantsci.2017.12.002.
- Rudenko, N. N., Borisova-Mubarakshina, M. M., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., Nadeeva-Zhurikova, E. M., and Ivanov, B. N. (2021) Role of plant carbonic anhydrases under stress conditions, in *Plant Stress Physiology* (Hossain, A., ed.) InTech, London, pp. 301-325, doi: 10.5772/intechopen.91971.
- Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Zhurikova, E. M., Yanyushin, M. F., and Ivanov, B. N. (2018) The multiplicity of functions of carbonic anhydrases in higher plants, in *Carbonic Anhydrases. Biochemistry, Mechanism of Action and Therapeutic Applications* (Penttinen, J., ed.) Nova Science Publishers, N. Y., pp. 111-137.
- Сорохтин О. Г., Ушаков С. А. (2002) Развитие Земли, Изд-во МГУ, Москва.
- Куприянова Е. В., Пронина Н. А. (2011) Карбоангидраза — фермент, преобразивший биосферу, *Физиология растений*, **58**, 163-176.
- Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., and Shitov, A. V. (2019) Carbonic anhydrase CAH3 supports the activity of photosystem II under increased pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 582-590, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.06.003.
- Reithmeier, R. A. (2001) A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers, *Blood Cells Mol. Dis.*, **27**, 85-89, doi: 10.1006/bcmd.2000.0353.
- Sly, W. S., and Hu, P. Y. (1995) Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies, *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 375-401, doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.002111.
- Эдвардс Дж., Уокер Д. (1986) Фотосинтез С3- и С4-растений: механизмы и регуляция, Мир, Москва.
- Moroney, J. V., Ma, Y., Frey, W. D., Fusilier, K. A., Pham, T. T., et al. (2011) The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles, *Photosynth. Res.*, **109**, 133-149, doi: 10.1007/s11120-011-9635-3.
- Neish, A. C. (1939) Chloroplasts. II. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf, *Biochem. J.*, **33**, 300-308, doi: 10.1042/bj0330300.
- Moroney, J. V., Bartlett, S. G., and Samuelsson, G. (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae, *Plant Cell Environ.*, **24**, 141-153, doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00669.x.
- Momayyezi, M., McKown, A. D., Bell, S. C. S., and Guy, R. D. (2020) Emerging roles for carbonic anhydrase in mesophyll conductance and photosynthesis, *Plant J.*, **101**, 831-844, doi: 10.1111/tpj.14638.
- Fabre, N., Reiter, I. M., Becuwe-Linka, N., Genty, B., and Rumeau, D. (2007) Characterization and expression analysis of genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$  carbonic anhydrases in *Arabidopsis*, *Plant Cell Environ.*, **30**, 617-629, doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x.
- Rudenko, N. N., Vetoshkina, D. V., Fedorchuk, T. P., and Ivanov, B. N. (2017) Effect of light intensity under different photoperiods on expression level of carbonic anhydrase genes of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -families in *Arabidopsis thaliana* leaves, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1025-1035, doi: 10.1134/S000629791709005X.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J.-B., Rudella, A., et al. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database, *Plant Cell*, **16**, 478-499, doi: 10.1105/tpc.017814.
- Wang, M., Zhang, Q., Liu, F.-C., Xie, W.-F., Wang, G.-D., et al. (2014) Family-wide expression characterization of *Arabidopsis* beta-carbonic anhydrase genes using qRT-PCR and promoter::GUS fusions, *Biochimie*, **97**, 219-227, doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.020.
- Soto, D., Córdoba, J. P., Villarreal, F., Bartoli, C., Schmitz, J., et al. (2015) Functional characterization of mutants affected in the carbonic anhydrase domain of the respiratory complex I in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, **83**, 831-844, doi: 10.1111/tpj.12930.
- Polishchuk, O. V. (2021) Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases, *Planta*, **253**, 58, doi: 10.1007/s00425-020-03553-5.
- Von Caemmerer, S., Quinn, V., Hancock, N. C., Price, G. D., Furbank, R. T., and Ludwig, M. (2004) Carbonic anhydrase and C4 photosynthesis: a transgenic analysis, *Plant Cell Environ.*, **27**, 697-703, doi: 10.1111/j.1365-3040.2003.01157.x.
- Игнатова Л. К., Москвин О. В., Иванов Б. Н. (2001) Влияние ингибиторов карбоангидразы на протонный обмен и фотосинтез протопластов гороха, *Физиология растений*, **48**, 545-550.
- Игнатова Л. К., Романова А. К. (1992) Участие карбоангидразы в ингибировании фотосинтеза протопластов гороха избытком CO<sub>2</sub>, *Физиология растений*, **39**, 711-717.
- Ignatova, L. K., Moskvina, O. V., Ivanov, B. N., and Romanova, A. K. (1993) The effect of CO<sub>2</sub> uptake by pea protoplasts on O<sub>2</sub> evolution rate and parameters of chlorophyll fluorescence quenching, *Plant Physiol. Biochem.*, **31**, 295-301.
- Utsunomiya, E., and Muto, S. (1993) Carbonic anhydrase in the plasma membranes from leaves of C3 and C4 plants, *Physiol. Plant.*, **88**, 413-419, doi: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01353.x.
- Wang, C., Hu, H., Qin, X., Zeise, B., Xu, D., et al. (2016) Reconstitution of CO<sub>2</sub> regulation of SLAC1 anion channel and function of CO<sub>2</sub>-Permeable PIP2;1 Aquaporin as Carbonic anhydrase 4 interactor, *Plant Cell*, **28**, 568-582, doi: 10.1105/tpc.15.00637.
- Zhao, M., Tan, H.-T., Scharwies, J., Levin, K., Evans, J. R., and Tyerman, S. D. (2017) Association between water and carbon dioxide transport in leaf plasma membranes: assessing the role of aquaporins, *Plant. Cell Environ.*, **40**, 789-801, doi: 10.1111/pce.12830.
- Terashima, I., Hanba, Y., Tazoe, Y., Vyas, P., and Yano, S. (2006) Irradiance and phenotype: comparative ecophysiology of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion, *J. Exp. Bot.*, **57**, 343-354, doi: 10.1093/jxb/erj014.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D., Bota, J., Otto, B., et al. (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is

- involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> *in vivo*, *Plant J.*, **48**, 427-439, doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02879.x.
33. Momayyezi, M., and Guy, R. D. (2018) Concomitant effects of mercuric chloride on mesophyll conductance and carbonic anhydrase activity in *Populus trichocarpa* Torr. & Gray, *Trees*, **32**, 301-309, doi: 10.1007/s00468-017-1632-5.
  34. Afzal, Z., Howton, T., Sun, Y., and Mukhtar, M. (2016) The roles of aquaporins in plant stress responses, *J. Dev. Biol.*, **4**, 9, doi: 10.3390/jdb4010009.
  35. DiMario, R. J., Quebedeaux, J. C., Longstreth, D. J., Dassanayake, M., Hartman, M. M., and Moroney, J. V. (2016) The cytoplasmic carbonic anhydrases  $\beta$  CA2 and  $\beta$  CA4 are required for optimal plant growth at low CO<sub>2</sub>, *Plant Physiol.*, **171**, 280-293, doi: 10.1104/pp.15.01990.
  36. Boron, W. F., Endeward, V., Gros, G., Musa-Aziz, R., and Pohl, P. (2011) Intrinsic CO<sub>2</sub> permeability of cell membranes and potential biological relevance of CO<sub>2</sub> channels, *Chem. Phys. Chem.*, **12**, 1017-1019, doi: 10.1002/cphc.201100034.
  37. Sunderhaus, S., Dudkina, N. V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., et al. (2006) Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants, *J. Biol. Chem.*, **281**, 6482-6488, doi: 10.1074/jbc.M511542200.
  38. Zabaleta, E., Martin, M. V., and Braun, H.-P. (2012) A basal carbon concentrating mechanism in plants? *Plant Sci.*, **187**, 97-104, doi: 10.1016/j.plantsci.2012.02.001.
  39. Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Bauwe, H., and Raghavendra, A. S. (2006) Markedly low requirement of added CO<sub>2</sub> for photosynthesis by mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*): possible roles of photorespiratory CO<sub>2</sub> and carbonic anhydrase, *Physiol. Plant.*, **128**, 763-772, doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00803.x.
  40. Simm, S., Papasotiriou, D. G., Ibrahim, M., Leisegang, M. S., Muller, B., et al. (2013) Defining the core proteome of the chloroplast envelope membranes, *Front. Plant Sci.*, **4**, 11, doi: 10.3389/fpls.2013.00011.
  41. Heckwolf, M., Pater, D., Hanson, D. T., and Kaldenhoff, R. (2011) The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO<sub>2</sub> transport facilitator, *Plant J.*, **67**, 795-804, doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04634.x.
  42. Tolleter, D., Chochois, V., Poiré, R., Price, G. D., and Badger, M. R. (2017) Measuring CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeabilities of isolated chloroplasts using a MIMS-18O approach, *J. Exp. Bot.*, **68**, 3915-3924, doi: 10.1093/jxb/erx188.
  43. Perez-Martin, A., Michelazzo, C., Torres-Ruiz, J. M., Flexas, J., Fernández, J. E., Sebastiani, L., and Diaz-Espejo, A. (2014) Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: correlation with gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins, *J. Exp. Bot.*, **65**, 3143-3156, doi: 10.1093/jxb/eru160.
  44. (Mubarakshina) Borisova, M. M., Kozuleva, M. A., Rudenko, N. N., Naydov, I. A., Klenina, I. B., and Ivanov, B. N. (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1314-1321, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.036.
  45. Wu, W., and Berkowitz, G. A. (1992) Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> exchange through chloroplast envelope ion channels, *Plant Physiol.*, **98**, 666-672, doi: 10.1104/pp.98.2.666.
  46. Okabe, K., Yang, S.-Y., Tsuzuki, M., and Miyachi, S. (1984) Carbonic anhydrase: Its content in spinach leaves and its taxonomic diversity studied with anti-spinach leaf carbonic anhydrase antibody, *Plant Sci. Lett.*, **33**, 145-153, doi: 10.1016/0304-4211(84)90004-X.
  47. Price, G. D., von Caemmerer, S., Evans, J. R., Yu, J.-W., Lloyd, J., et al. (1994) Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation, *Planta*, **193**, 331-340, doi: 10.1007/BF00201810.
  48. Ferreira, F. J., Guo, C., and Coleman, J. R. (2008) Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced *Arabidopsis* seedling survivorship, *Plant Physiol.*, **147**, 585-594, doi: 10.1104/pp.108.118661.
  49. Majeau, N., and Coleman, J. R. (1992) Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding tobacco chloroplastic carbonic anhydrase, *Plant Physiol.*, **100**, 1077-1078, doi: 10.1104/pp.100.2.1077.
  50. Anderson, L. E., and Carol, A. A. (2004) Enzyme co-localization with Rubisco in pea leaf chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **82**, 49-58, doi: 10.1023/B:PRES.0000040443.92346.37.
  51. Wang, L., Jin, X., Li, Q., Wang, X., Li, Z., and Wu, X. (2016) Comparative proteomics reveals that phosphorylation of  $\beta$  carbonic anhydrase 1 might be important for adaptation to drought stress in *Brassica napus*, *Sci. Rep.*, **6**, 39024, doi: 10.1038/srep39024.
  52. Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., et al. (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway enroute to the higher plant chloroplast, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1224-1231, doi: 10.1038/ncb1330.
  53. Buren, S. (2010) Targeting and function of CAH1-Characterisation of a novel protein pathway to the plant cell chloroplast. PhD Thesis, Umea University, Sweden.
  54. Комарова Ю. М., Доман Н. Г., Шапошникова Г. Л. (1982) Две формы карбоангидразы в хлоропластах бобов, *Биохимия*, **47**, 1027-1034.
  55. Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., and Ivanov, B. N. (2015) Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 798-813, doi: 10.1134/S0006297915060048.
  56. Руденко Н. Н., Игнатова Л. К., Каморницкая В. Б., Иванов Б. Н. (2006) Присутствие нескольких карбоангидраз в тилакоидах листьев гороха, *Докл. АН*, **408**, 553-555.
  57. Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., and Ivanov, B. N. (2007) Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms, *Photosynth. Res.*, **91**, 81-89, doi: 10.1007/s1120-007-9148-2.
  58. Wydrzynski, T., and Govindjee (1975) A new site of bicarbonate effect in Photosystem II of photosynthesis: evidence from chlorophyll fluorescence transients in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **387**, 403-408, doi: 10.1016/0005-2728(75)90121-8.
  59. Van Rensen, J. J. S., Tonk, W. J. M., and de Bruijn, S. M. (1988) Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary quinone electron acceptor of photosystem II via the non-haem iron of the quinone-iron acceptor complex, *FEBS Lett.*, **226**, 347-351, doi: 10.1016/0014-5793(88)81452-2.
  60. Khristin, M. S., Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Ivanov, B. N., and Klimov, V. V. (2004) Photosystem II associated carbonic anhydrase activity in higher plants is situated in core complex, *FEBS Lett.*, **577**, 305-308, doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.001.
  61. Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Khristin, M. S., and Ivanov, B. N. (2006). Heterogeneous origin of carbonic anhydrase activity of thylakoid membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 525-532, doi: 10.1134/s0006297906050099.

62. Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Mudrik, V. A., Fedorchuk, T. P., and Ivanov, B. N. (2011) Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynth. Res.*, **110**, 89–98, doi: 10.1007/s11120-011-9699-0.
63. Swader, J. A., and Jacobson, B. S. (1972) Acetazolamide inhibition of photosystem II in isolated spinach chloroplasts, *Phytochemistry*, **11**, 65–70, doi: 10.1016/S0031-9422(00)89968-9.
64. Shitov, A. V., Zharmukhamedov, S. K., Shutova, T. V., Allakhverdiev, S. I., Samuelsson, G., and Klimov, V. V. (2011) A carbonic anhydrase inhibitor induces bicarbonate-reversible suppression of electron transfer in pea photosystem 2 membrane fragments, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **104**, 366–371, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.04.001.
65. Федорчук Т. П., Опанасенко В. К., Руденко Н. Н., Иванов Б. Н. (2018) Исследование стимуляции фотофосфорилирования бикарбонатом в изолированных тилакоидах: эффекты ингибиторов карбоангидраз, *Биологические мембраны*, **35**, 34–41.
66. Shitov, A. V., Terentyev, V. V., Zharmukhamedov, S. K., Rodionova, M. V., Karacan, M., et al. (2018) Is carbonic anhydrase activity of photosystem II required for its maximum electron transport rate? *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 292–299, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.01.009.
67. Klimov, V. V., Hulsebosch, R. J., Allakhverdiev, S. I., Wincencjusz, H., Van Gorkom, H. J., and Hoff, A. J. (1997) Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 16277–16281, doi: 10.1021/bi9717688.
68. Klimov, V., and Baranov, S. (2001) Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1503**, 187–196, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00222-X.
69. Ignatova, L., Zhurikova, E., and Ivanov, B. (2019) The presence of the low molecular mass carbonic anhydrase in photosystem II of C3 higher plants, *J. Plant Physiol.*, **232**, 94–99, doi: 10.1016/j.jplph.2018.11.017.
70. Пронина Н. А., Аллахвердиев С. И., Куприянова Е. В., Клячко-Гурвич Г. Л., Климов В. В. (2002) Локализация карбоангидразы в субхлоропластных частицах гороха, *Физиология растений*, **49**, 431–439.
71. Fedorchuk, T. P., Kireeva, I. A., Opanasenko, V. K., Terentyev, V. V., Rudenko, N. N., et al. (2021) Alpha carbonic anhydrase 5 mediates stimulation of ATP synthesis by bicarbonate in isolated arabidopsis thylakoids, *Front. Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2021.662082.
72. Fedorchuk, T., Rudenko, N., Ignatova, L., and Ivanov, B. (2014) The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from *Arabidopsis* leaves, *J. Plant Physiol.*, **171**, 903–906, doi: 10.1016/j.jplph.2014.02.009.
73. Stenmler, A. J. (1997) The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase, *Physiol. Plant.*, **99**, 348–353, doi: 10.1034/j.1399-3054.1997.990220.x.
74. Журикова Е. М., Игнатова Л. К., Семенова Г. А., Руденко Н. Н., Мудрик В. А., Иванов Б. Н. (2015) Влияние нокаута гена альфа-карбоангидразы 4 на фотосинтетические характеристики *Arabidopsis thaliana* и накопление крахмала в листьях, *Физиология растений*, **62**, 602–608.
75. Zhurikova, E. M., Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Mudrik, V. A., Vetoshkina, D. V., and Ivanov, B. N. (2016) Participation of two carbonic anhydrases of alpha family in photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1182–1187, doi: 10.1134/S0006297916100151.
76. Rudenko, N. N., Fedorchuk, T. P., Vetoshkina, D. V., Zhurikova, E. M., Ignatova, L. K., and Ivanov, B. N. (2018) Influence of knockout of *At4g20990* gene encoding  $\alpha$ -CA4 on photosystem II light-harvesting antenna in plants grown under different light intensities and day lengths, *Protoplasma*, **255**, 69–78, doi: 10.1007/s00709-017-1133-9.
77. Rudenko, N. N., Fedorchuk, T. P., Terentyev, V. V., Dymova, O. V., Naydov, I. A., et al. (2020) The role of carbonic anhydrase  $\alpha$ -CA4 in the adaptive reactions of photosynthetic apparatus: the study with  $\alpha$ -CA4 knockout plants, *Protoplasma*, **257**, 489–499, doi: 10.1007/s00709-019-01456-1.
78. Virgin, I., Styring, S., and Andersson, B. (1988) Photosystem II disorganization and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes, *FEBS Lett.*, **233**, 408–412, doi: 10.1016/0014-5793(88)80472-1.
79. Villarejo, A., Shutova, T., Moskvina, O., Forssen, M., Klimov, V. V., and Samuelsson, G. (2002) A photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution, *EMBO J.*, **21**, 1930–1938, doi: 10.1093/emboj/21.8.1930.
80. Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., et al. (2008) The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the  $O_2$  evolution rate by proton removal, *EMBO J.*, **27**, 782–791, doi: 10.1038/emboj.2008.12.
81. Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., Ashikhmin, A. A., Tikhonov, K. G., and Shitov, A. V. (2020) The main structural and functional characteristics of photosystem-II-enriched membranes isolated from wild type and *cia3* mutant *Chlamydomonas reinhardtii*, *Life*, **10**, 63, doi: 10.3390/life10050063.
82. Koroidov, S., Shevela, D., Shutova, T., Samuelsson, G., and Messinger, J. (2014) Mobile hydrogen carbonate acts as proton acceptor in photosynthetic water oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6299–6304, doi: 10.1073/pnas.1323277111.
83. Süss, K. H., Arkona, C., Manteuffel, R., and Adler, K. (1993) Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5514–5518.
84. Бабаджанова М. П., Бабаджанова М. А., Алиев К. А. (2002) Свободный и мембраносвязанный мультиферментные комплексы цикла Кальвина листьев хлопчатника, *Физиология растений*, **49**, 663–669.
85. Punnett, T., and Iyer, R. V. (1964) The enhancement of photophosphorylation and the hill reaction by carbon dioxide, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2335–2339, doi: 10.1016/S0021-9258(20)82238-8.
86. Подорванов В. В., Золотарева Е. К., Черноштан А. А. (2005) Роль гидрокарбоната в светозависимом поглощении протонов изолированными хлоропластами, *Физиология и биохимия культурных растений*, **37**, 326–332.
87. Онойко Е. Б., Полищук А. В., Золотарева Е. К. (2010) Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы, *Доп. НАН України*, **10**, 160–165.
88. Missner, A., Kügler, P., Saparov, S. M., Sommer, K., Mathai, J. C., et al. (2008) Carbon dioxide transport through membranes, *J. Biol. Chem.*, **283**, 25340–25347, doi: 10.1074/jbc.M800096200.
89. Süss, K.-H. (1990) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-binding chloroplast thylakoid membrane proteins. *In vitro* evidence that  $H^+$ -ATP synthase may serve as a membrane receptor, *Z. Naturforsch.*, **45**, 633–637.

90. Jebanathirajah, J. A., and Coleman, J. R. (1998) Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*, *Planta*, **204**, 177-182, doi: 10.1007/s004250050244.
91. Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., Böhmer, M., Xue, S., et al. (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 87-93, doi: 10.1038/ncb2009.
92. Tian, W., Hou, C., Ren, Z., Pan, Y., Jia, J., et al. (2015) A molecular pathway for CO<sub>2</sub> response in Arabidopsis guard cells, *Nat. Commun.*, **6**, 6057, doi: 10.1038/ncomms7057.
93. Wang, X., Suzawa, T., Ohtsuka, H., Zhao, B., Miyamoto, Y., et al. (2010) Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway, *J. Cell. Physiol.*, **225**, 709-719, doi: 10.1002/jcp.22267.
94. Graham, D., and Reed, M. (1971) Carbonic anhydrase and the regulation of photosynthesis, *Nat. New Biol.*, **231**, 81-83, doi: 10.1038/newbio231081a0.
95. Slaymaker, D. H., Navarre, D. A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G. B., and Klessig, D. (2002) The tobacco salicylic acid binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11640-11645, doi: 10.1073/pnas.182427699.

## UNSOLVED PROBLEMS OF CARBONIC ANHYDRASES FUNCTIONING IN PHOTOSYNTHETIC CELLS OF HIGHER C3 PLANTS

### Review

N. N. Rudenko and B. N. Ivanov\*

*Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: ivboni@rambler.ru*

The review presents current data on carbonic anhydrases found in various compartments of the photosynthetic cells of the higher plants. The available data on the gene expression of some of these carbonic anhydrases and its dependence on environmental factors and plant age are considered. The existing hypotheses about the functions of carbonic anhydrases of plasma membrane, cytoplasm as well as of stroma and thylakoids of chloroplast, first of all, about the participation of these enzymes in the feeding of carbon dioxide molecules to ribulose-bisphosphate carboxylase (Rubisco) are analyzed. The difficulties of establishing the physiological role of plant cell carbonic anhydrase are described in detail.

**Keywords:** carbonic anhydrase, higher plants, photosynthesis, chloroplasts, thylakoids

УДК 577.12

## ГИДРОПЕРОКСИД-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

### Обзор

© 2021 М.Г. Шарипов<sup>1\*</sup>, С.В. Гудков<sup>2,3,4</sup>, В.З. Ланкин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино,  
Московская обл., Россия; электронная почта: sharapov.mars@gmail.com

<sup>2</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603022 Нижний Новгород, Россия

<sup>4</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050 Большие Вяземы, Россия

<sup>5</sup> ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 121552 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 06.07.2021

Принята к публикации 06.07.2021

В обзоре представлены современные данные о молекулярных механизмах развития окислительного стресса. Рассмотрены основные этапы свободнорадикальных реакций в процессе окислительного стресса. Обсуждаются эндогенные и экзогенные причины развития окислительного стресса, включая дисфункцию системы оксидоредуктаз клетки, а также воздействие различных внешних физико-химических факторов. Описаны основные участники антиоксидантной системы защиты, а также этапы её эволюции, при этом основной акцент сделан на нескольких семействах пероксидаз: пероксиредоксинах, глутатионпероксидазах и глутатион-S-трансферазах, которые достаточно близки по своим филогенетическим, структурным и каталитическим свойствам. Подробно рассмотрены субстратная специфичность, сходства и различия механизмов катализа этих ферментов. Обсуждается роль пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз в регуляции внутриклеточных и межклеточных сигналов, опосредованных гидропероксидами и взаимодействием с другими рецепторными/нерецепторными белками. Показана важная роль этих ферментов не только в антиоксидантной защите, но также в регуляции таких процессов клетки как рост, дифференцировка и апоптоз.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** окислительный стресс, активные формы кислорода, свободные радикалы, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы.

DOI: 10.31857/S0320972521100067

### АФК, СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Потребление кислорода является неотъемлемым проявлением жизни аэробных организмов. Переход на кислородное окисление органических субстратов способствовал увеличению эффективности получения энергии, а также обеспечил бурный эволюционный прогресс живых организмов [1]. Тем не менее у такой формы

метаболического прогресса существует обратная сторона — возможность образования побочных продуктов кислородного дыхания, таких как активные формы кислорода (АФК).

**Источники АФК.** Известно, что примерно 90% АФК в клетке образуется в митохондриях из-за утечки электронов на молекулярный кислород в дыхательной цепи [2, 3]. По расчётам, утечка электронов в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий составляет 1–2% от об-

Принятые сокращения: АФГ — активные формы галогенов; АФК — активные формы кислорода; РФА — реактивные формы азота; СР — свободный радикал; ПОЛ — перекисное окисление липидов;  $O_2^{\cdot -}$  — супероксидный анион-радикал; GPx — глутатионпероксидаза; GR — глутатионредуктаза; Grx — глутаредоксин; GSH — глутатион; GST — глутатион-S-трансфераза;  $C_r$  — пероксидазный остаток цистеина (peroxidatic Cys);  $C_R$  — восстанавливающий остаток цистеина (resolving Cys); In $^{\cdot}$  — свободные радикалы антиоксидантов;  $HO^{\cdot}$  — гидроксильный радикал;  $L^{\cdot}$  — алкильный липидный радикал; LH — полиненасыщенные жирные кислоты;  $LO^{\cdot}$  — липоксильный радикал;  $LOO^{\cdot}$  — липопероксильный радикал; LOOH — липогидропероксид; PDI — протеиндисульфидизомераза; Prx (Prdx) — пероксиредоксин;  $RO^{\cdot}$  — алкоксильный радикал; SOD — супероксиддисмутаза; Trx — тиоредоксин; TrxR — тиоредоксинредуктаза.

\* Адресат для корреспонденции.

шего потока [4]. Примерно 0,2% потребляемого кислорода переходит в супероксидный анион-радикал  $O_2^{\cdot-}$ , а 0,4% превращается в  $H_2O_2$ . Примечательно, что в нормальных условиях такая пропорция (1 : 2) между  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  постоянна и не зависит от концентрации кислорода в воздушной среде и частоты дыхания. При этом чем выше метаболическая активность тканей/клеток, тем больше образуется АФК [5]. Например, миокард, в котором митохондрии составляют до 25–30% от массы, потребляет около 8 мМ кислорода в минуту, при этом образуя ~ 0,1 мМ супероксидных анион-радикалов. Превышение нормального потребления кислорода клетками чрезвычайно опасно, т.к. во время гипероксии скорость утечки электронов в митохондриях и образования АФК прямо пропорционально увеличению парциального давления кислорода. Например, здоровые взрослые крысы умирают в течение 72 часов, если их поместить в атмосферу 100% кислорода, что в 5 раз превышает его нормальную концентрацию в воздухе [6].

Оставшиеся 10% образующихся АФК в клетке в нормальных условиях приходится на работу индуцируемых ферментов-оксидаз: NADPH-оксидазы (NOX), ксантиноксидазы (XO), циклооксигеназы (COX), NO-синтазы (NOS) и т.д. [7]. Следует отметить, что вклад индуцируемых ферментов-оксидаз в образование эндогенных АФК может значительно возрастать. Например, было показано, что NADPH-оксидазы в нейтрофилах, макрофагах и клетках микроглии до 90% потребляемого кислорода могут конвертировать в  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  [7].

**Классификация АФК.** По физико-химическим свойствам АФК можно разделить на две больших группы: радикальные и нерадикальные. Радикальные формы АФК содержат один или несколько неспаренных электронов, в результате чего они являются чрезвычайно нестабильными и высокореакционноспособными. Такие радикальные АФК за короткий период времени рекомбинируют друг с другом или реагируют с субстратом. Радикал может отдать свой неспаренный электрон или, напротив, забрать электрон у другой молекулы, чтобы стабилизировать электронную оболочку. Атакованная радикалом молекула, в свою очередь, сама становится свободным радикалом (СР), что запускает цепную реакцию и приводит к повреждению находящихся в непосредственной близости биомолекул [8].

К радикальным АФК обычно относят: супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный радикал ( $HO^{\cdot}$ ), гидропероксильный радикал ( $HO_2^{\cdot}$ ), алкоксильный радикал ( $RO^{\cdot}$ ), пероксильный радикал ( $RO_2^{\cdot}$ ) и др. К нерадикальным

АФК относятся пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), органические гидропероксиды ( $ROOH$ ), а также синглетный кислород ( $^1O_2$ ) и озон ( $O_3$ ) [1].

Термин АФК вобрал в себя очень широкий спектр соединений как неорганической, так и органической природы, обладающих различными свойствами. Это связано с тем, что АФК (особенно свободнорадикальные) способны вступать в реакции практически с любыми молекулами. Например, АФК могут взаимодействовать с соединениями азота, тем самым способствуя образованию реактивных форм азота (РФА), таких как: монооксид азота ( $NO^{\cdot}$ ), диоксид азота ( $NO_2^{\cdot}$ ), пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot-}$ ), пероксиазотистая кислота ( $ONOOH$ ) и др. Взаимодействие АФК с галогенами приводит к образованию гипогалогенитов ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $HOI$ ), относящихся к активным формам галогенов (АФГ). Для продуктов цепного окисления липидов: липидных радикалов (алкильный  $L^{\cdot}$ , алкоксильный  $LO^{\cdot}$ , липопероксильный  $LOO^{\cdot}$ ) и гидропероксидов ( $LOOH$ ), иногда применяется термин «активные формы липидов» [9]. Для СР белковой природы ( $P^{\cdot}$ ,  $RS^{\cdot}$ ) чаще всего используют термины «долгоживущие радикалы белков» и «долгоживущие активные формы белков» [10]. Следует отметить, что АФК, РФА и АФГ в ходе биохимических и СР-процессов реагируют друг с другом, переходя из одной формы в другую, тем самым оказывая комплексное влияние на биологические системы [11]. В табл. 1 приведены характеристики основных видов АФК, РФА, АФГ и СР, встречающихся в живых организмах.

Как видно из табл. 1 (см. стандартный электродный потенциал  $E^{\circ}$ ) наиболее реакционноспособными являются свободнорадикальные формы АФК, такие как гидроксильный ( $HO^{\cdot}$ ) или алкоксильный ( $RO^{\cdot}$ ) радикалы, которые способны модифицировать любые молекулы. В то же время менее реакционноспособные АФК являются более долгоживущими и имеют возможность диффундировать на большее расстояние от источника возникновения, что потенциально может нести большую угрозу для клетки.

Из представленных материалов следует, что восстановление пероксида водорода и органических (прежде всего, липидных) гидропероксидов с участием ферментов-пероксидаз (пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз) должно играть ключевую роль в предотвращении окислительного стресса (см. ниже), поскольку  $H_2O_2$  и природные органические гидропероксиды ( $ROOH$ ,  $LOOH$ ) при их разложении (гомолизе) служат основным источником активных СР ( $HO^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$  и  $LO^{\cdot}$  соот-

**Таблица 1.** Основные виды активных форм кислорода (АФК), реактивных форм азота (РФА), активных форм галогенов (АФГ) и свободных радикалов (СР) в биологических системах

| Свободный радикал/<br>оксид/пероксид |                                                      | Формула         | $t_{1/2}$ , с     | $R_d$ , мкм | $E^\circ$ , В (рН 7,0)*                                      | Реакции образования АФК                                                                                                                                                                                                                                                   | Катализ**                   |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| АФК                                  | Синглетный кислород                                  | $^1O_2$         | $10^{-6}$         | 0,3         | —                                                            | $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + ^1O_2$ ,<br>$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + OCl^-$ ,<br>$OCl^- + H_2O_2 \rightarrow Cl^- + H_2O + ^1O_2$ ,<br>$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH^\cdot + HO^- + ^1O_2$ ,<br>$O_2^{\cdot -} + OH^\cdot + H^+ \rightarrow H_2O + ^1O_2$ . | Cat<br>—<br>MPO<br>MPO<br>— |
|                                      | Супероксидный анион-радикал                          | $O_2^{\cdot -}$ | $10^{-6}$         | 0,3         | $O_2/O_2^{\cdot -} = -0,33$<br>$O_2^{\cdot -}/H_2O_2 = 0,93$ | $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$                                                                                                                                                                                                                                     | NOX, XO,<br>CytC            |
|                                      | Озон                                                 | $O_3$           | секунды           | —           | $O_3/O_3^{\cdot -} = 1,03$<br>$O_3/O_2 = 1,66$               | $3O_2 + h\nu \rightarrow 2O_3$<br>285 кДж/моль                                                                                                                                                                                                                            | УФ                          |
|                                      | Гидроксильный радикал                                | $HO^\cdot$      | $10^{-9}$         | <0,01       | $HO^\cdot/H_2O = 2,34$                                       | $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow HO^\cdot + HO^- + ^1O_2$ ,<br>$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^\cdot + Fe^{3+} + HO^-$ ,<br>$ClO^- + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow HO^\cdot + Fe^{3+} + Cl^-$ .                                                                           | —<br>—<br>—                 |
|                                      | Пергидроксильный радикал                             | $HOO^\cdot$     | $10^{-6}-10^{-3}$ | 10          | $HO_2^\cdot/H_2O_2 = 1,48$                                   | $O_2^{\cdot -} + H_2O \rightarrow HOO^\cdot + HO^-$                                                                                                                                                                                                                       | —                           |
|                                      | Пероксид водорода                                    | $HOOH$          | стабилен          | 1–10        | $H_2O_2/H_2O = 1,35$                                         | $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ,<br>$2HO_2^\cdot \rightarrow H_2O_2 + ^1O_2$ .                                                                                                                                                           | SOD<br>—                    |
|                                      | Алкоксильный радикал                                 | $RO^\cdot$      | $10^{-6}$         | #           | $RO^\cdot/ROH = 1,60$                                        | $Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + RO^\cdot$                                                                                                                                                                                                                    | —                           |
|                                      | Пероксильный радикал                                 | $ROO^\cdot$     | $10^{-5}$         | #           | $RO_2^\cdot/RO_2H = 1,00$                                    | $R^\cdot + O \rightarrow ROO^\cdot$                                                                                                                                                                                                                                       | —                           |
|                                      | Алкилгидропероксид                                   | $ROOH$          | стабилен          | #           | —                                                            | $ROO^\cdot + RH \rightarrow ROOH + R^\cdot$ ,<br>$ROO^\cdot + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow ROOH$ .                                                                                                                                                                           | —                           |
|                                      | Липоксильный радикал                                 | $LO^\cdot$      | $10^{-6}$         | #           | —                                                            | $Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + LO^\cdot$                                                                                                                                                                                                                    | —                           |
|                                      | Липопероксильный радикал                             | $LOO^\cdot$     | $10^{-3}$         | #           | —                                                            | $L^\cdot + O_2 \rightarrow LOO^\cdot$                                                                                                                                                                                                                                     | —                           |
|                                      | Липогидропероксид                                    | $LOOH$          | стабилен          | #           | —                                                            | $LOO^\cdot + LH \rightarrow LOOH + L^\cdot$ ,<br>$LOO^\cdot + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow LOOH$ .                                                                                                                                                                           | —                           |
| АФГ                                  | Хлорноватистая кислота                               | $HOCl$          | стабилен          | —           | $ClO^-/Cl^- = 1,28$                                          | $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$                                                                                                                                                                                                                             | MPO,<br>EPX                 |
|                                      | Бромноватистая кислота                               | $HOBr$          | стабилен          | —           | $BrO^-/Br^- = 1,59$                                          | $H_2O_2 + Br^- + H^+ \rightarrow HOBr + H_2O$                                                                                                                                                                                                                             |                             |
|                                      | Йодноватистая кислота                                | $HOI$           | стабилен          | —           | $HIO_3/I_2 = 1,19$                                           | $H_2O_2 + I^- + H^+ \rightarrow HOI + H_2O$                                                                                                                                                                                                                               |                             |
| РФА                                  | Монооксид азота (оксид азота (II), нитрозил радикал) | $NO^\cdot$      | 1–10              | 50–1000     | $NO/N_2O = 1,59$                                             | $L-Arg + NADPH_2 + O_2 \rightarrow NO^\cdot + L-цитруллин$                                                                                                                                                                                                                | NOS                         |
|                                      | Диоксид азота (оксид азота (IV), двуокись азота)     | $NO_2^\cdot$    | $10^{-1}-1$       | 100         | $NO_2^\cdot/NO_2^- = 1,04$                                   | $ONOOCO_2^- \rightarrow CO_3^{\cdot -} + NO_2^\cdot$                                                                                                                                                                                                                      | —                           |
|                                      | Пероксинитрит                                        | $ONOO^-$        | 0,5–1             | 1–4         | $ONOO^-/NO_2^- = 1,20$<br>$ONOO^-/NO_2^\cdot = 1,40$         | $O_2^\cdot + NO^\cdot \rightarrow ONOO^-$<br>$ONOO^- + H^+ \rightarrow OH^\cdot + NO_2^\cdot$                                                                                                                                                                             | —                           |

Окончание таблицы

| Свободный радикал/<br>оксид/пероксид |                                                          | Формула      | $t_{1/2}$ , с | $R_d$ , мкм | $E^\circ$ , В (рН 7,0)*                                            | Реакции образования АФК                                                                              | Катализ** |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------|---------------|-------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| РФА                                  | Пероксиазотистая кислота                                 | ONOOH        | 1,3           | —           | $NO_3^-/NO = 0,95$<br>$NO_3^-/HNO_2 = 0,93$                        | $ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$                                                                     | —         |
|                                      | Нитрозильный катион                                      | $NO^+$       | стабилен      | —           | —                                                                  | $NO^\bullet - e^- \rightarrow NO^+$                                                                  | —         |
|                                      | Нитроксильный анион                                      | $NO^-$       | стабилен      | —           | —                                                                  | $NO^\bullet + e^- \rightarrow NO^-$                                                                  | —         |
|                                      | Триоксид диазота (оксид азота (III), азотистый ангидрид) | $N_2O_3$     | секунды       | —           | $N_2O_3/N_2O_5 = 0,9$                                              | $NO + NO_2 \rightarrow N_2O_3$                                                                       | —         |
|                                      | Тетраоксид диазота                                       | $N_2O_4$     | секунды       | —           | $N_2O_4/HNO_2 = 1,06$                                              | $2NO_3^- + 2H_2O + 2e^- \rightarrow N_2O_4 + 4HO^-$                                                  | —         |
|                                      | Азотистая кислота                                        | $HNO_2$      | секунды       | —           | $HNO_2/N_2O = 1,29$<br>$HNO_2/NO = 0,98$<br>$HNO_2/H_2N_2O = 0,86$ | $N_2O_4 + 2H_3O^+ + 2e^- \rightarrow 2HNO_2 + 2H_2O$                                                 | —         |
|                                      | Нитрил хлорид                                            | $ClNO_2$     | секунды       | —           | —                                                                  | $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$ ,<br>$NO_2^- + HOCl + H^+ \rightarrow ClNO_2 + H_2O$ . | MPO       |
| Прочие СР                            | Алкильный радикал                                        | $R^\bullet$  | $>10^{-6}$    | #           | —                                                                  | $HO^\bullet + RH \rightarrow H_2O + R^\bullet$ ,<br>$RO^\bullet + LH \rightarrow ROH + L^\bullet$ .  | —         |
|                                      | Липоалкильный радикал                                    | $L^\bullet$  | $10^{-8}$     | #           | —                                                                  | $HO^\bullet + LH \rightarrow H_2O + L^\bullet$ ,<br>$LO^\bullet + LH \rightarrow LOH + L^\bullet$ .  | —         |
|                                      | Тиильный радикал                                         | $RS^\bullet$ | $>10^{-6}$    | #           | —                                                                  | $R^\bullet + R'-SH \rightarrow R'-S^\bullet + RH$                                                    | —         |
|                                      | Радикалы белков                                          | $P^\bullet$  | $1-10^5$      | #           | —                                                                  | $P + \gamma \rightarrow P^\bullet + hv$                                                              | —         |
|                                      | Радикалы антиоксидантов                                  | $In^\bullet$ | $10^{-3}$     | #           | —                                                                  | $LOO^\bullet + InH \rightarrow In^\bullet$                                                           | —         |

Примечание. Таблица составлена на основании материалов опубликованных ранее работ [10, 12–19].

\* Значения стандартного электродного потенциала ( $E^\circ$ ) взяты из ранее опубликованных работ [15, 16]. # Радиус диффузии ( $R_d$ ) зависит от размера молекулы. Средняя скорость диффузии липидов в мембране 2 мкм/с [17]. Исходя из времени существования радикалов и гидропероксидов, радиус диффузии таких молекул составляет  $10^{-6}-10^{-3}$  мкм.

\*\* Cat – каталаза, MPO – миелопероксидаза, EPX – пероксидаза эозинофилов, NOX – NADPH-оксидаза, XO – ксантиноксидаза, CytC – цитохром c-оксидаза, SOD – супероксиддисмутаза, NOS – NO-синтазы, hv – фотоны,  $\gamma$  – фотоны большой энергии (гамма-квант, рентгеновское излучение).

ветственно), способных инициировать или продолжить цепное СР-окисление биомолекул.

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Окислительный стресс – состояние в биологических системах, при котором уровень генерируемых АФК превосходит возможности их утилизации антиоксидантными системами, что приводит к нарушению редокс-регуляции и накоплению окислительно поврежденных биомо-

лекул. Следует отметить, что в настоящее время окислительный стресс подразделяют на эустресс и дистресс [20].

Окислительный эустресс происходит при кратковременном превышении уровня АФК в физиологическом диапазоне (для  $H_2O_2$  – это концентрация ниже 100 нМ), что обеспечивает передачу клеточных сигналов, защиту от патогенов и т.д., при этом окислительные изменения макромолекул обратимы. АФК при окислительном эустрессе зачастую эндогенного происхождения и связаны с активацией клеточных окси-

даз (см. выше) [20]. Эндогенные АФК регулируют активность многих белков через взаимодействие с редокс-чувствительными элементами (Redox-Sensitive Elements – RSE), представленными в белках остатками метионина, цистеина, селеноцистеина и простетическими группами, содержащими ионы металлов переменной валентности. К таким важнейшим регуляторным белкам с RSE относятся протеинкиназы (ERK, JNK, STAT, p38 и др.), фосфатазы (PTEN, SHP-2 и др.), металлопротеиназы (MMP), ростовые факторы (TGF, TNF $\alpha$ , EGF и др.), транскрипционные факторы (Nrf2, NF- $\kappa$ B, HIF, AP-1 и др.) и прочие [21, 22].

Окислительный дистресс сопровождается кратковременным или длительным увеличением уровня АФК, значительно превышающего физиологическую норму (для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – это концентрация свыше 100 нМ), что приводит к необратимым окислительным модификациям макромолекул, запуску патологических процессов, остановке деления и гибели клетки [20]. Рост уровня АФК при окислительном дистрессе зачастую вызван внешними неблагоприятными факторами (ионизирующее излучение, УФ излучение, ксенобиотики и т.д.).

Таким образом, АФК играют двойную роль в жизни аэробных организмов. С одной стороны (окислительный эустресс), АФК используются в защите организма от патогенов («кислородный взрыв», опосредованный NADPH-оксидазой клеток иммунной системы), участвуют в нейтрализации ксенобиотиков, передаче сигналов внутри клеток и между клетками. С другой стороны, когда продукция АФК превышает антиоксидантные способности клетки (окислительный дистресс), происходят необратимые повреждения на всех уровнях организации (молекулярном, клеточном, тканевом, органном), провоцирующие развитие многих патологических состояний [23].

### ПОВРЕЖДЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ДЕЙСТВИЕМ АФК

АФК являются химически высокоактивными агентами, которые легко вступают в реакцию с самыми разнообразными классами веществ, подвергая их окислительной модификации. АФК вызывают окислительные повреждения важнейших биологических макромолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов), что приводит к нарушению их структуры и функции и впоследствии к повреждению клеток и тканей. Избыточная продукция АФК, особенно в сочетании с недостаточностью компенсаторных воз-

можностей систем антиоксидантной защиты, приводит к окислительно-восстановительному дисбалансу и развитию/усугублению патологических изменений на всех уровнях организации организма [8]. Зачастую уровень АФК увеличивается прямо пропорционально тяжести патологического состояния. При старении в организме человека также наблюдается интенсификация образования АФК. Большинство из этих процессов протекает достаточно медленно, поэтому организм успевает адаптироваться, что приводит к нивелированию повреждающей роли АФК в долгосрочной перспективе. Из этого следует, что крайне важным в этиологии и развитии любой патологии является скорость изменения про- и антиоксидантного баланса (резкое увеличение уровня АФК или уменьшение активности антиоксидантных систем). Тем не менее на практике определение сбалансированности про- и антиоксидантных систем затруднительно, в связи с чем степень поврежденности клеток, тканей и организма при воздействии окислительного стресса определяют по проявлению его последствий, а именно: по наличию модифицированных биомолекул. За последние десятилетия разработан широкий спектр методов и тест-систем, которые позволяют на количественном уровне определять уровень модифицированных окислительным стрессом биологических макромолекул [11].

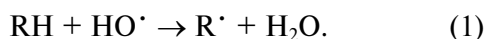
**Окислительные повреждения ДНК.** Окислительные повреждения ДНК являются одним из самых критических последствий окислительного стресса для клетки. Окислительные повреждения ДНК тесно связаны с процессами мутагенеза, канцерогенеза, старения и ряда сопряженных с ним возрастных патологий. В настоящее время идентифицировано более ста продуктов окислительного повреждения ДНК [24]. Основными из них являются: пиримидиновые димеры, ДНК-белковые сшивки, одонитевые разрывы ДНК, двунитевые разрывы ДНК, окислительные повреждения дезоксирибозы, формидопиримидиновые производные пуринов, гидроксильированные производные и различные другие окисленные дериваты азотистых оснований. Одним из основных маркёров окислительных повреждений ДНК, безусловно, является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-оксогуанин) [25].

8-Оксогуанин образуется в ДНК под действием синглетного кислорода и гидроксильных радикалов. При окислительном стрессе любой этиологии данное повреждение составляет не менее 5% от общего количества окисленных оснований в ДНК. Исходя из этого, в настоящее время 8-оксогуанин рассматривается как один из ключевых биомаркёров окислительного стресса и

СР-повреждения ДНК [26]. Установлено, что 8-оксогуанин обладает неоднозначными кодирующими свойствами, следствием чего являются точечные мутации ДНК, нарушения репликации и транскрипции. В клетках человека 8-оксогуанин распознается и восстанавливается с помощью специфического фермента репарации hOGG1 (оксогуанингликозилаза 1 человека), причём потеря одного аллеля гена *hOGG1* увеличивает мутагенное действие 8-оксогуанина. Рост уровня 8-оксогуанина в ДНК увеличивает количество трансверсионных мутаций, чаще всего: G—C → T—A. Эта мутация является одной из самых распространенных соматических мутаций при онкологических заболеваниях [27].

**Окислительные повреждения белков.** Окислительные повреждения белков приводят к существенным нарушениям в нормальном функционировании клеточных систем. Эти повреждения проявляются в изменении функций рецепторов, ферментов, транспортных белков, ответственных за формирование антигенов, способных вызвать аутоиммунную реакцию и т.п. Окисление белков сопровождается рядом структурных изменений, к которым можно отнести окислительные повреждения аминокислот, включая образование дисульфидных связей, межбелковых сшивок, разрывов полипептидной цепи, денатурацию и агрегацию белковых молекул [28]. Кроме того, окислительные повреждения белков способны инициировать вторичное повреждение других биологических молекул. Классическим примером этого является повреждение репарационных ферментов, ведущее к их инактивации, что в конечном итоге вызывает изменение кодирующих свойств ДНК.

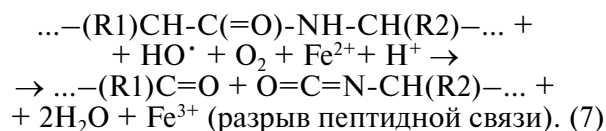
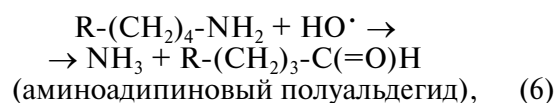
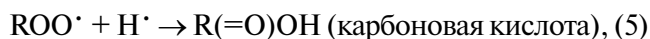
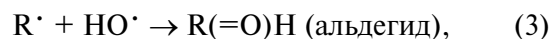
В настоящее время не вызывает сомнений, что СР-окисление белков в организме млекопитающих тесно связано с процессами старения и разнообразными физиологическими нарушениями. Считается, что СР-окисление белков играет важную роль в развитии атеросклероза, артрита, диабета, катаракты, мышечной дистрофии, сердечно-легочной недостаточности и нервно-дегенеративных болезней [29]. Анализ и систематика окислительных повреждений белков является достаточно сложной задачей. Окисление белков различными АФК может приводить к образованию аминокислотных радикалов, которые, реагируя с кислородом, образуют пероксильные органические радикалы, которые, в свою очередь, способны участвовать в образовании многочисленных продуктов окисления. Инициатором окисления белков чаще всего выступает гидроксильный радикал:



Образовавшийся алкильный радикал, взаимодействуя с кислородом, образует пероксильный радикал:



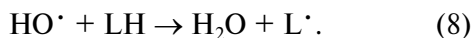
Кроме того, в ходе окисления белков образуются различные карбонильные (>C=O) соединения по следующим механизмам:



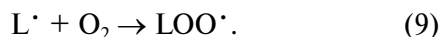
Карбонильные группы белков являются наиболее часто регистрируемыми маркерами их окислительных повреждений. Карбонильные группы возникают как при прямом окислении аминокислотных остатков АФК, так и при взаимодействии аминокислотных остатков с альдегидами (в том числе и со вторичными молекулярными продуктами перекисного окисления липидов) [30]. Основными продуктами окислительного повреждения аминокислот являются дитиозин, формилкинуренин, гидроксильированные валин и лейцин, дигидроксифенилаланин, ортотиозин, 2-оксогистидин, глутаминовый и аминоадипиновый полуальдегид и т.п. Дитиозин в организме не катаболизирует и выводится с мочой, что делает его удобным биомаркером повреждения аминокислот при окислительном стрессе.

**Окислительные повреждения липидов.** Очевидно, что полиеновые липиды, вследствие наличия двойных связей, являются наиболее подверженными СР-окислению природными субстратами. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ) протекает по цепному механизму. В инициировании цепной реакции ПОЛ важную роль играет гидроксильный радикал. Будучи небольшой по размеру незаряженной частицей, он способен проникать в толщу гидрофобного липидного слоя и вступать в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (LH), входящими в

состав надмолекулярных липид-белковых природных комплексов — биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. При этом образуются липидные радикалы:



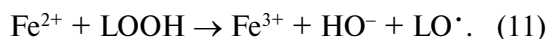
Образовавшийся липидный радикал ( $\text{L}^\bullet$ ) вступает в реакцию с растворённым в среде молекулярным кислородом, вследствие чего образуется липопероксильный радикал ( $\text{LOO}^\bullet$ ):



Липопероксильный радикал атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием липопероксида ( $\text{LOOH}$ ) и нового радикала  $\text{L}^\bullet$ :



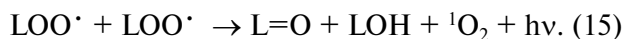
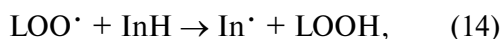
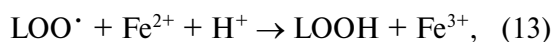
Чередование реакций 9 и 10 представляет собой цепную реакцию перекисного окисления липидов. Существенное ускорение перекисации липидов наблюдается в присутствии ионов двухвалентного железа, в ходе которого происходит разветвление цепей окисления липидов:



Образующиеся радикалы  $\text{LO}^\bullet$  инициируют новые цепи окисления липидов:



При СР-окислении биомембран в экспериментальных условиях цепи окисления могут состоять из десятка и более звеньев, однако в организме обычно возможно не более 2–3 разветвлений цепей, вследствие наличия большого числа «тушителей», обрывающих цепную реакцию. Цепи СР-окисления липидов могут обрываться в результате взаимодействия СР с антиоксидантами ( $\text{InH}$ ), ионами металлов переменной валентности или друг с другом:



Реакция 13 сопровождается хемилюминесценцией, интенсивность которой отражает скорость перекисного окисления липидов в различных объектах [9].

Следовательно, свободнорадикальное ПОЛ приводит к образованию первичных молекуляр-

ных продуктов — гидропероксидов ненасыщенных жирных кислот, причём в качестве вторичных молекулярных продуктов окисления накапливаются ненасыщенные альдегиды, среди которых наиболее известны 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид (МДА), являющиеся признанными биомаркерами окислительного стресса. Кроме того, к биомаркерам окислительного стресса можно отнести изопростаны — специфические продукты окисления ряда высоконенасыщенных жирных кислот, таких как арахидоновая, эйкозапентеновая и докозагексеновая кислоты. МДА и другие низкомолекулярные дикарбонилы способны к образованию межмолекулярных ковалентных связей с белками и нуклеиновыми кислотами [30]. В биологических системах нейтрализацию потенциально опасных гидропероксидов липидов (предшественников карбонильных соединений) преимущественно осуществляют три семейства гидропероксид-восстанавливающих ферментов: пероксиредоксины ( $\text{Prx}$ ), глутатионпероксидазы ( $\text{GPx}$ ) и глутатион-S-трансферазы ( $\text{GST}$ ), свойства которых далее будут подробно рассмотрены.

## АНТИОКСИДАНТЫ

Соединения, способные предотвращать образование АФК или нейтрализующие их, получили название антиоксидантов. В физиологических условиях низкомолекулярные природные антиоксиданты (преимущественно фенольные структуры) могут нейтрализовать АФК вследствие неферментных реакций за счёт своей способности отдавать или принимать электрон(ы), тем самым устраняя неспаренные/нестабильные состояния активных радикалов. В результате взаимодействия ингибиторов свободнорадикальных реакций ( $\text{InH}$ ) со свободными радикалами образуются СР-формы антиоксидантов ( $\text{In}^\bullet$ ), которые менее активны и менее опасны, чем исходные [1]. Таким образом, действие природных антиоксидантов состоит не в полном прекращении СР-окисления, а в его задержке в результате перехвата неспаренных электронов с активных радикалов молекулами ингибитора:



Исходя из этого, при интенсивном СР-окислении возможно уменьшение концентрации восстановленных форм фенольных ингибиторов с накоплением семихинонов, способных вновь инициировать окисление органических

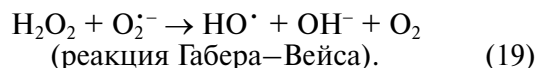
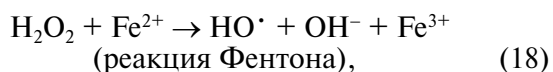
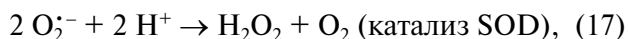
субстратов. В организме существуют буферные восстановительные системы (аскорбат, глутатион), которые участвуют в неферментной биорегенерации антиоксидантов. При недостаточности этих систем антиоксидантное ингибирование СР-процессов (особенно при высоких уровнях антиоксидантов) может вызывать прооксидантный эффект (конверсия антиоксидантного действия в прооксидантное) за счёт инициации окисления биосубстратов накопившимися СР-формами антиоксидантов [31]. Это обстоятельство затрудняет использование низкомолекулярных антиоксидантов в медицинских целях.

Токсическое действие АФК предотвращается в организме за счёт низкомолекулярных антиоксидантов, представленных широким спектром низкомолекулярных соединений (таких как токоферолы, флавоноиды, аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион, мелатонин, эрготионеин и др.), и специализированными ферментами — высокомолекулярными антиоксидантами [1]. Несомненно, наиболее эффективным путём элиминации АФК является ферментативный катализ. Для этой цели в ходе эволюции возникли различные антиоксидантные ферменты, включая супероксиддисмутазы (SOD) для дисмутации супероксидного анион-радикала, а также широкий спектр пероксидаз: каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST), глутамил-цистеин синтазы (GCS), глутаредоксины (Grx), тиоредоксины (Trx), пероксиредоксины (Prx) и др. В связи с необходимостью систематизации накопленных данных в этой работе основное внимание уделено гидропероксид-восстанавливающим ферментам клетки: Prx, GPx и GST.

**Эволюция антиоксидантной системы.** В настоящее время у всех исследованных аэробных и анаэробных организмов обнаружены специализированные ферментные антиоксидантные системы защиты. Системы детоксикации АФК стали насущной необходимостью после «великого кислородного события» или «кислородной катастрофы», т.е. появления и накопления в атмосфере Земли свободного кислорода (~2,4–2,5 млрд лет назад), что привело к глобальной смене восстановительных условий на окислительные. Существует мнение, что при увеличении концентрации кислорода в атмосфере Земли дыхательная цепь бактерий и митохондрий эукариот вначале действовала как средство детоксикации  $O_2$ , т.е. исходно энергетическую и защитную функцию могли выполнять одни и те же биокатализаторы (ферменты или их аналоги). Такими системами «двойного назначения» могли быть компоненты электрон-транспортной цепи, наиболее важными из кото-

рых являются гемопротейды и железосерные белки. В дальнейшем при специализации этих белков, по-видимому, произошло их разделение на, собственно, энергопреобразующие и защитные — антиоксидантные [32]. Нельзя исключить, что ещё на стадии предбиологической эволюции произошло разделение низкомолекулярных соединений на кофакторы и протекторы (антиоксиданты). Тем не менее некоторые хиноны (убихинон, пластохинон, менадион и др.) у современных организмов функционируют и как переносчики электронов, и в качестве антиоксидантов. Наличие кислорода в воде и атмосфере неизбежно должно было сопровождаться спонтанным образованием его полувосстановленной формы — супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ). При спонтанной дисмутации радикалов  $O_2^{\cdot-}$  (скорость  $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ) образуется пероксид водорода, причём более эффективно эту реакцию катализирует фермент супероксиддисмутаза — SOD (скорость  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ), представленная во всех царствах, а также железосерный белок — рубредоксин (супероксидредуктаза), обнаруженный у архей и бактерий [33]. Примечательно, что у многих прокариот железосерные белки являются регуляторами экспрессии генов антиоксидантных ферментов [34]. Можно полагать, что одними из первых ферментов-антиоксидантов, возникших ещё на заре «великого кислородного события», являются супероксиддисмутазы. Гены, кодирующие SOD, обнаружены во всех известных аэробных организмах (от бактерий до человека) и происходят от двух основных предков. Один ген дал начало Cu/Zn-содержащим SOD, второй ген дал начало ферментам, содержащим ионы Mn, Fe и Ni. Супероксиддисмутазы — высококонсервативные ферменты, участки вблизи активных центров обладают высокой гомологией между различными царствами. У млекопитающих обнаружено три изоформы SOD, которые локализуются в митохондриях (Mn-содержащая SOD2), цитоплазме (Cu/Zn-содержащая SOD1) и во внеклеточном пространстве (Cu/Zn-содержащая SOD3) [35]. При увеличении уровня  $O_2$  в атмосфере наблюдается адаптивный рост уровня экспрессии SOD как у про-, так и у эукариот, что вызывает увеличение SOD-активности в клетках и позволяет снизить токсическое действие  $O_2$  [36, 37]. Образующийся в процессе катализируемой SOD дисмутации радикалов  $O_2^{\cdot-}$  пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) (реакция 17) представляет большую опасность вследствие возможности его разложения в присутствии ионов железа с образованием высокоактивного гидроксильного радикала ( $HO^{\cdot}$ ) (реакции 18 и 19), окислительные и повреждающие биологические

структуры свойства которого значительно выше, чем у  $O_2^{\cdot -}$  радикала (табл. 1):



Восстановление  $H_2O_2$ , образовавшейся в ходе дисмутации супероксидного анион-радикала, обеспечивают пероксидазы, которые представлены многочисленными семействами ферментов, в активных центрах которых может присутствовать гем, ионы Mn, SH- или SeH-группы. Прежде всего, следует отметить каталазу — гем-содержащий фермент, восстанавливающий  $H_2O_2$  до воды и молекулярного кислорода ( $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ ). При этом максимальную активность каталазы проявляет при очень высоких концентрациях  $H_2O_2$  (сотни mM). Такие высокие концентрации  $H_2O_2$  в живой клетке практически не встречаются, вероятно, именно поэтому до 80% внутриклеточной каталазы содержится в специализированных органеллах клетки — пероксисомах, в которых может наблюдаться локальное повышение концентрации пероксида водорода до миллимолярных значений [38]. Более эффективными восстановителями  $H_2O_2$  являются пероксидазы, содержащие в активном центре цистеин или селеноцистеин, такие как: пероксиредоксины, Se-содержащие глутатионпероксидазы и неселеновые глутатион-S-трансферазы. Важно отметить, что некоторые из этих ферментов обладают способностью восстанавливать не только  $H_2O_2$ , но и различные органические гидропероксиды. Вероятно, опасность возможного окисления  $HO^{\cdot}$  радикалом органических субстратов (прежде всего полиеновых липидов) вызвало в процессе эволюции расширение субстратной специфичности ряда пероксидаз. У высших организмов наличие глутатионпероксидаз и пероксиредоксинов в значительной степени заместило потребность в каталазе [4]. Действительно, наследственное отсутствие в тканях каталазы (акаталаземия или болезнь Такахары) не является фатальной, в то время как нокаут генов некоторых глутатионпероксидаз приводит к летальным исходам ещё в эмбриогенезе, а нокауты генов пероксиредоксинов приводят к тяжёлым окислительным поражениям тканей (см. далее). Эти ферменты эффективно элиминируют избыточный уровень  $H_2O_2$ , а также снижают уровень ПОЛ, что очень важно для поддержания

нормальной структуры и функций биологических мембран.

**Эволюция тиол-содержащих оксидоредуктаз.** Некоторые аминокислоты оказались весьма чувствительными к действию молекулярного кислорода или его производных — АФК. Показано, что His, Met, Cys, Trp и Tyr наиболее чувствительны к окислительным модификациям. Окисление остатков Cys в белках представляется особенно важным, поскольку тиольная группа (SH-) может проходить через несколько стадий окислительных превращений, которые влияют на структуру и функцию белка. Следует отметить, что остатки Cys в белках проявляют различную восприимчивость к окислению из-за физико-химических свойств тиольной группы, а также микроокружения (соседние остатки аминокислот) в конкретной третичной структуре. Например, в активных центрах Prx остаток цистеина образует водородные связи с остатками Thr и Arg, которые способствуют депротонированию Cys-SH. Константа диссоциации (pKa) пероксидазного остатка цистеина значительно ниже (~7,3), чем у свободного цистеина (~8,5). Таким образом, при физиологическом значении pH сульфгидрильная группа активного Cys может подвергаться депротонированию и участвовать в обратимых или необратимых окислительных превращениях в ответ на изменения внутриклеточной окислительно-восстановительной среды [39].

Первичным продуктом окисления Cys-SH является сульфеновая кислота (Cys-SOH), которая нестабильна и может реагировать с тиольной группой других остатков Cys с образованием внутри- или межмолекулярных дисульфидов. Альтернативно, Cys-SOH реагирует с восстановленным глутатионом (GSH), образуя смешанные глутатион-белковые дисульфиды (так называемое глутатионилирование, Cys-SSG), или окисляется до сульфиновой кислоты (Cys-SO<sub>2</sub>H). Сульфиновая кислота может быть либо восстановлена до сульфгидрильной формы с помощью сульфиредоксинов и тиоредоксинов, либо подвергаться дальнейшему необратимому окислению до сульфоновой кислоты (Cys-SO<sub>3</sub>H), что зачастую приводит к инактивации белка или изменению его функции (см. ниже). Кроме того, Cys-SH и тиольный радикал (RS<sup>•</sup>) могут реагировать с активными формами азота (РФА) и ковалентно присоединять монооксид азота с образованием Cys-SNO в реакции S-нитрозилирования. Среди окисленных форм Cys особый интерес представляют стабильные и в значительной степени устойчивые к дальнейшему окислению внутримолекулярные дисульфиды, которые могут подвергаться обратимому

восстановлению. Образование и разрыв дисульфидных связей, вероятно, эволюционно использовались для изменения функции белка, позволяя адаптировать активность белка к изменяющейся окислительно-восстановительной среде. Эти реакции участвуют в регуляции важных метаболических процессов в соответствии с условиями окружающей среды и потребностями клетки [40].

Восстановление дисульфидных связей белков до уровня сульфгидрильных групп (SH-) осуществляется главным образом за счёт тиоредоксиновой системы, которая состоит из субстрата – восстановленного глутатиона, FAD-зависимого фермента глутатионредуктазы (GR), глутаредоксина (Grx), тиоредоксинредуктазы (TrxR) и тиоредоксина (Trx). Следует отметить, что в живых организмах, помимо трипептида глутатиона, обнаружены другие тиольные восстановители: коэнзимы (A, B, M), глутатионамид, глутатионспермидин, гамма-глутамилцистеин, миколтиол, бациллотриол, эрготионеин, овотиол, трипанотиол. Тем не менее наиболее распространенным восстановителем, встречающимся во всех царствах, является именно GSH. Глутатион – это универсальная молекула-адаптер, а система GSH/Trx в большинстве аэробных организмов служит центральной метаболической системой для удаления или модификации эндогенных электрофильных соединений (АФК, РФА, карбонилы), а также многочисленных ксенобиотиков. GSH представлен в высокой концентрации в цитозоле (1–11 мМ), ядре (3–15 мМ) и митохондриях клетки (5–11 мМ). Вероятно, система GSH/Trx возникла у аэробных организмов на самых ранних этапах эволюции, что отчасти объясняет её вовлеченность практически во все клеточные процессы [41].

Таким образом, вышеуказанные тиол-содержащие оксидоредуктазы посредством дитиол-дисульфидного обмена участвуют в структурной и функциональной модификации различных окисленных белков, в том числе регуляторных. Именно благодаря изменению степени окисления остатков Cys регуляторных белков клетки нашли способ модулировать различные сигнальные пути. При этом важнейшую роль в регуляции таких процессов играют Trx-подобные оксидоредуктазы. Система тиоредоксинов эволюционировала как ключевой окислительно-восстановительный компонент в живых организмах, участвуя в реакциях дитиол-дисульфидного обмена со множеством белков, контролируя основные сигнально-каталитические функции клетки при различных физиологических условиях. Филогенетические исследования Trx-по-

добных белков показали, что система этих белков имеет древнее происхождение и, начиная с появления жизни на земле, играет ключевую роль донора электронов, управляя антиоксидантными системами и регулируя функцию белков в ответ на изменения окислительно-восстановительной среды [42].

**Тиоредоксин-подобные оксидоредуктазы.** В связи с тем, что тиол-содержащие оксидоредуктазы представлены обширным классом ферментов, мы сконцентрировали основное внимание на нескольких семействах Trx-подобных оксидоредуктаз: тиоредоксинах, пероксиредоксинах, глутатионпероксидазах и глутатион-S-трансферазах. Тиоредоксин-подобные оксидоредуктазы – это глобулярные белки с характерной Trx-подобной укладкой (фолдом), который представляет собой последовательность четырёх  $\beta$ -стрендов и трёх  $\alpha$ -спиралей ( $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ ). На рис. 1 представлены структуры четырёх семейств ферментов: тиоредоксинов, пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз. Эти семейства достаточно сильно различаются по аминокислотным последовательностям (например, человеческий Trx1 гомологичен с Prx6 на ~12%, а с GPx1 – на ~8%), но при этом все они имеют общий тиоредоксиновый фолд – высококонсервативную эволюционно древнюю трёхмерную структуру [43]. Аналогичная укладка характерна и для других тиол-содержащих оксидоредуктаз: глутаредоксинов (Grx), протеиндисульфидизомераз (PDI) и т.д. По некоторым оценкам, впервые тиоредоксиновая укладка появилась уже около 4 млрд лет назад у общего предка архебактерий (last archaeal common ancestor – LACA), т.е. задолго до «кислородной катастрофы» на нашей планете [43]. Это указывает на то, что свободно-радикальные процессы происходили в «первичном» океане при отсутствии кислородной атмосферы, причём, наиболее вероятно, это были тиольные радикалы (табл. 1).

Для многих Trx-подобных оксидоредуктаз характерно наличие консервативного пероксидазного сайта (мотива), которым у тиоредоксинов является последовательность типа Cys-x-x-Cys, где два остатка цистеина разделены двумя любыми аминокислотами. В случае пероксиредоксинов один из цистеинов замещён на треонин – Thr-x-x-Cys. Для глутатионпероксидаз характерен мотив Cys/Sec-x-x-Thr, где вместо цистеина (на  $\beta 3$ -стренде) может быть селеноцистеин – Sec (рис. 1). Наличие селеноцистеина почти на 3 порядка увеличивает эффективность пероксидазной реакции, что объясняется высокой реакционной способностью Sec [44]. Для некоторых глутатион-S-трансфераз также показано

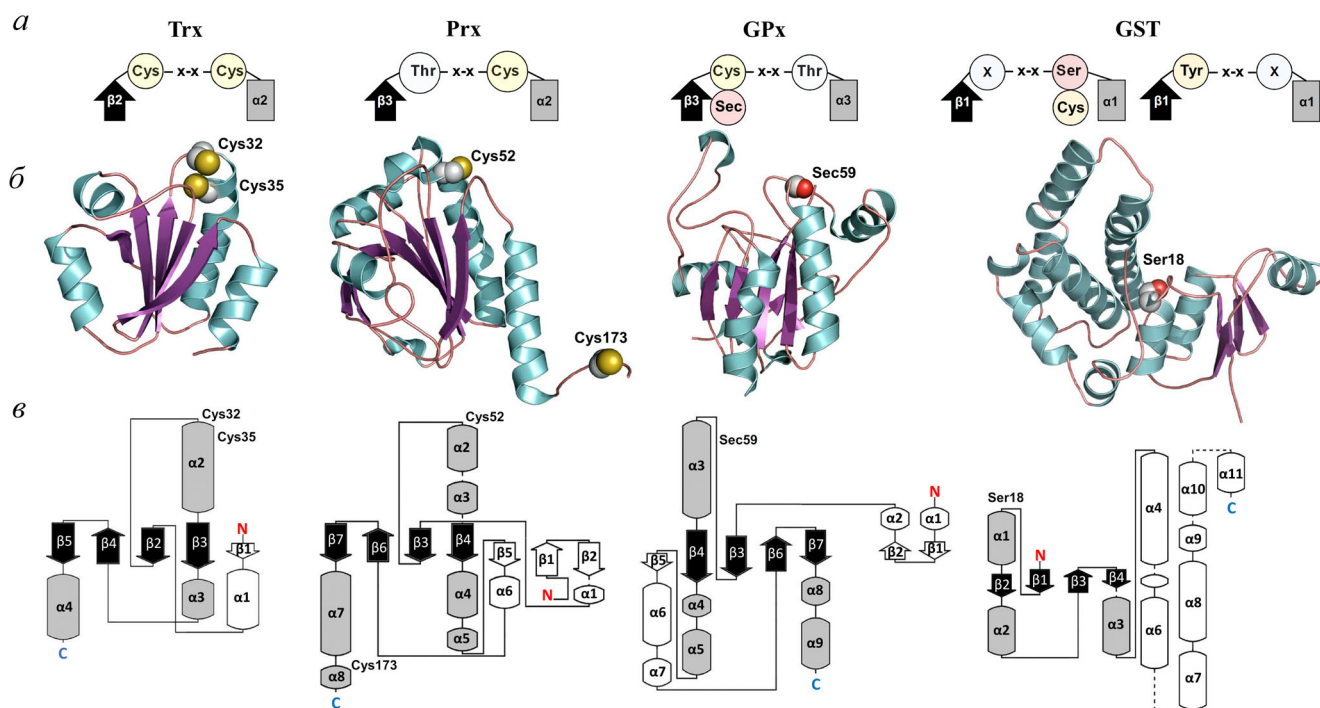


**Рис. 1.** Структурная характеристика тиоредоксинов (Trx), пероксиредоксинов (Prx), глутатионпероксидаз (GPx) и глутатион-S-трансфераз (GST). *а* – Мотивы пероксидазного каталитического центра. *б* – Схема трёхмерной структуры Trx1, Prx1, GPx1 и GSTA1 человека (PyMOL v0.99). *в* – Укладка вторичных элементов указанных ферментов. Серым и черным выделены  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -стренды, относящиеся к общей тиоредоксиновой укладке

наличие одного из остатков Cys в каталитическом центре, однако чаще всего он замещён на остаток серина (Ser/Cys-GST) или тирозина (Tyr-GST) [45].

**Тиоредоксины.** Современные биоинформатические исследования указывают на то, что Trx являются наиболее древними ферментами среди оксидоредуктаз (возникли около 4 млрд лет назад). Этим может объясняться их вовлечённость во многие клеточные процессы, связанные с восстановлением окисленных остатков цистеина, причём тиоредоксины можно считать предками пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз.

Тиоредоксины – семейство небольших белков (~12 кДа), катализирующих окислительно-восстановительные реакции путём дитиол-дисульфидного обмена с участием двух редокс-активных остатков Cys, разделённых двумя аминокислотами (рис. 1). Trx осуществляют восстановление дисульфидных связей в белках, благодаря чему участвуют в самых различных процессах: 1) общий метаболизм клетки, например, в качестве субстрата для рибонуклеотидредуктазы в синтезе ДНК и 3'-фосфоаденилсульфатредуктазы – при ассимиляции серы; 2) антиоксидантная система – восстановление антиоксидантных ферментов, таких как 2-Cys-пероксиредоксины (см. ниже), и метионинсульфоксидредуктазы;

3) клеточные сигнальные пути, где Trx служит для регуляции ферментов в ответ на сигналы окружающей среды; 4) функции, не связанные напрямую с окислительно-восстановительной реакцией, такие как действие шаперонов, восстанавливающих нативную структуру денатурированных белков [42].

Тиоредоксины обнаружены у всех живых организмов: от архебактерий до человека. Геном *Escherichia coli* кодирует два тиоредоксина: *TXN1* и *TXN2* и одну тиоредоксинредуктазу (*TXNRD*). В геноме человека также обнаружено два гена тиоредоксина: цитозольного (*TXN1*) и митохондриального (*TXN2*) и два гена тиоредоксинредуктазы: цитозольной (*TXNRD1*) и митохондриальной (*TXNRD2*). У растений обнаружено 20 изоформ Trx, имеющих довольно схожую первичную структуру как с прокариотами, так и с эукариотами [46]. Вероятно, такое большое количество изоформ Trx у растений связано с появлением хлоропластов (фотосинтеза), функция которых сопряжена с высоким уровнем образования АФК. Примечательно, что несмотря на различия в первичной структуре (например, Trx1 архебактерий и человека гомологичны на ~27%), все Trx имеют очень консервативную трёхмерную структуру. Небольшие отличия касаются протяжённости  $\alpha 3$ -спирали, которая ответственна за стабильность структуры белка [47].

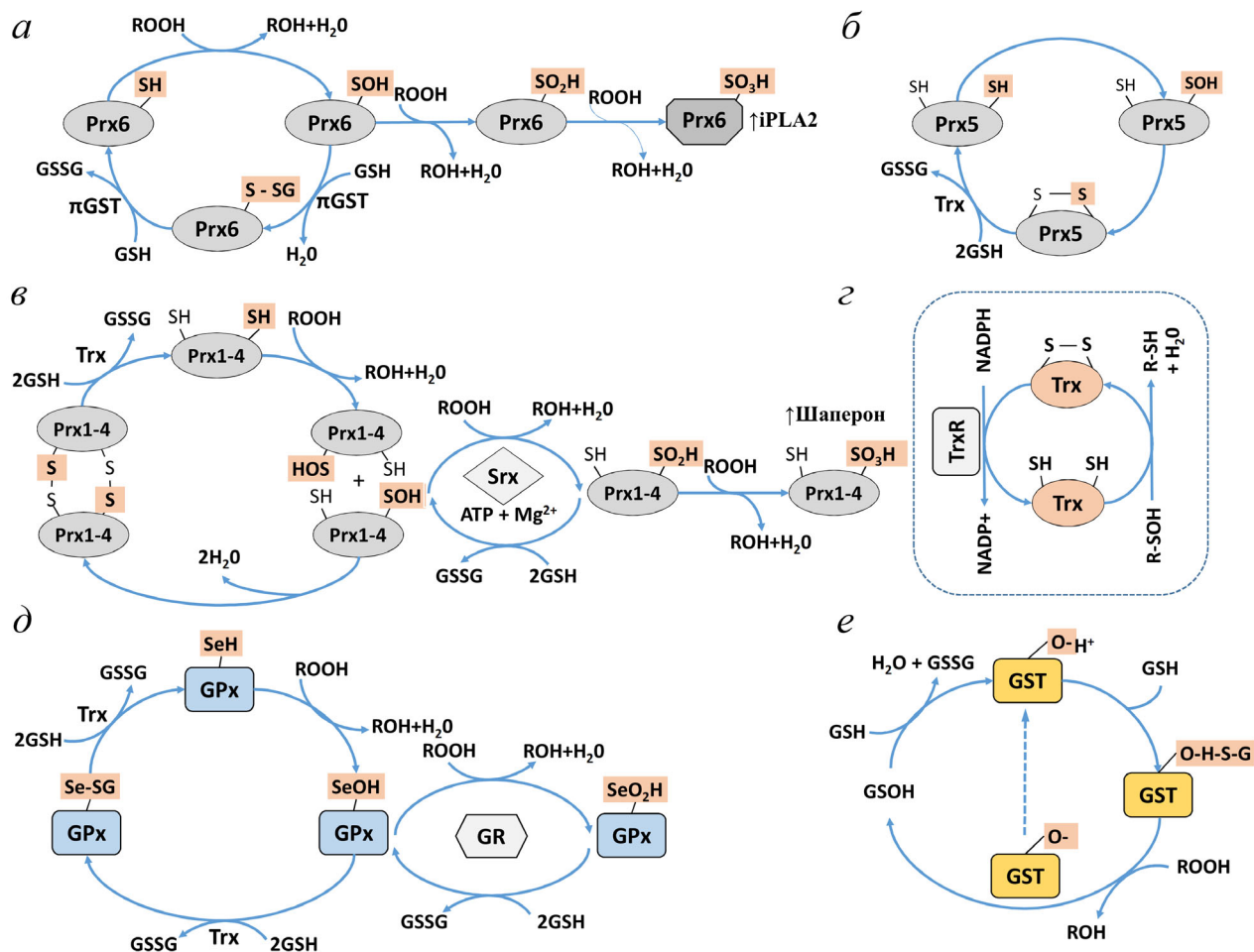


**Рис. 2.** Схемы каталитических циклов: *a* – 1-Cys-пероксиредоксинов (Prx6); *б* – атипичных 2-Cys пероксиредоксинов (Prx5); *в* – типичных 2-Cys-пероксиредоксинов (Prx1–4); *г* – тиоредоксинов (Trx); *д* – селен-содержащих глутатион-пероксидаз (GPx) и *е* – глутатион-S-трансфераз (GSTA1). ROOH – гидропероксиды, GSH – глутатион восстановленный, GSSG – глутатион окисленный, Srx – сульфоредаксыны, GR – глутатионредуктаза, TrxR – тиоредоксинредуктазы, πGST – глутатион-S-трансфераза π, iPLA2 – Ca<sup>2+</sup>-независимая активность фосфолипазы A2 белка Prx6

Каталитический цикл Trx включает три этапа. 1) Тиольная группа N-концевого остатка Cys тиоредоксина атакует дисульфидную связь, формируя дисульфидную связь с остатком Cys белка-мишени. 2) Затем тиольная группа C-концевого остатка Cys тиоредоксина восстанавливает дисульфидную связь комплекса Trx–белок-мишень, при этом сам Trx окисляется. 3) Окисленный тиоредоксин восстанавливается тиоредоксинредуктазой в NADPH-зависимой реакции и вновь включается в каталитический цикл [46]. Схема каталитического цикла Trx представлена на рис. 2. Тиоредоксины играют исключительно важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках животных. Мыши, нокаутные по *TXN1* или *TXN2*, погибают ещё на ранних стадиях эмбрионального развития [48, 49]. Основные характеристики тиоредоксинов человека представлены в табл. 2.

**Пероксиредоксины.** Пероксиредоксины (Prx) – эволюционно древнее семейство пероксидаз, широко представленное в живом мире. Пероксиредоксины обнаружены во всех компартментах клетки, во всех тканях (но преимущественно эпителиального происхождения). Для катализа Prx используют консервативный остаток Cys в активном центре [69]. Современная классификация Prx основана на числе цистеинов (1 или 2 остатка) в активном центре и особенностях механизма катализа. Необходимым для катализа и характерным для всех пероксиредоксинов (как 1-Cys Prx, так и 2-Cys Prx) является «пероксидазный» остаток цистеина в N-концевой области – C<sub>p</sub> (peroxidatic cysteine). У 2-Cys Prx в C-концевой области белка располагается дополнительный «восстанавливающий» остаток цистеина – C<sub>r</sub> (resolving cysteine). Пероксидазный остаток цистеина C<sub>p</sub> окружён тремя консервативными

Таблица 2. Сравнение семейств антиоксидантных ферментов человека

| Свойства                       | Trx                                                                | Prx                                                                                                           | GST                                                                                                                                                                                                                                                        | GPx                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Количество изоформ у человека  | 2 изоформы: Trx1, Trx2                                             | 6 изоформ: Prx1–Prx6                                                                                          | 17 цитозольных изоформ: (α)/GSTA – 5 шт., (μ)/GSTM – 5 шт., (ω)/GSTO – 2 шт., (π)/GSTP – 1 шт., (σ)/GSTS – 1 шт., (θ)/GSTT – 2 шт., (ζ)/GSTZ – 1 шт.<br>1 митохондриальная: (κ)/GSTK – 1 шт.<br>6 мембраносвязанных: MGST1, MGST2, MGST3, LTC4, FLAP, PGES | 8 изоформ: GPx1–GPx8                                                                                                                                                                                                                        |
| Локализация в клетке           | цитоплазма (Trx1), ядро (Trx1), секрция (Trx1), митохондрии (Trx2) | цитоплазма (Prx1,2,5,6), ЭПР (Prx4), митохондрии (Prx3,5), лизосомы (Prx6), ядро (Prx1,2,6), секрция (Prx4,6) | цитоплазма/ядро, митохондрии, микросомы (мембраносвязанные); в соответствии с классификацией                                                                                                                                                               | цитоплазма (GPx1,4), ЭПР (GPx4,8), митохондрии (GPx4), мембраносвязанные (GPx8), ядро (GPx1,4), секрция (GPx3,5,6,7)                                                                                                                        |
| Локализация в тканях, органах  | во всех органах и тканях                                           | во всех органах и тканях; преимущественно в эпителиальных                                                     | во всех органах и тканях; в большем количестве представлены в желудочно-кишечном тракте, печени и лёгких                                                                                                                                                   | GPx1 – во всех тканях, преимущественно в эритроцитах, печени и почках; GPx2 – желудочно-кишечный тракт; GPx3,8 – почки; GPx4 – семенники, сетчатка глаз; GPx5 – придатки семенников; GPx6 – обонятельный эпителий; GPx7 – эпителий пищевода |
| Основные регуляторы экспрессии | ARE (Antioxidant-Responsive Element), Nrf2, NF-κB, Ref-1, AP-1     | ARE, Nrf2, NF-κB, HIF, AP-1, c-Мyc, C/EBP, FOXO3                                                              | ARE, XRE (Xenobiotic-Responsive Element), GRE (Glucocorticoid-Responsive Element), BBE (Barbie Box Element), AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), MAF (Macrophage Activation Factor), NRL (Neural Retina Leucine Zipper), JNK, Fos, NF-κB                      | ARE, Nrf2, NF-κB, HIF, p63, AP-1, Sp1, NF-Y                                                                                                                                                                                                 |
| Молекулярный вес (диапазон)    | 12–18 кДа                                                          | 13–30 кДа                                                                                                     | 23–28 кДа                                                                                                                                                                                                                                                  | 20–25 кДа                                                                                                                                                                                                                                   |
| Трёхмерная структура           | тиоредоксиновая укладка                                            | тиоредоксиновая укладка                                                                                       | тиоредоксиновая укладка                                                                                                                                                                                                                                    | тиоредоксиновая укладка                                                                                                                                                                                                                     |
| Четвертичная структура         | гомодимеры (Trx1,2)                                                | мономер (Prx5), гомодимеры (Prx1,2,3,4,6), олигомеры (Prx1,2,3,4,6)                                           | гомодимеры/гетеродимеры для всех изоформ                                                                                                                                                                                                                   | гомотетрамеры (GPx1,2,3,5,6), димеры (GPx4,7,8)                                                                                                                                                                                             |
| Пероксидазный центр (мотив)    | <u>Cys</u> -X-X- <u>Cys</u> (Trx1,2)                               | Thr-X-X- <u>Cys</u> (Prx1–6)                                                                                  | <u>Tyr</u> (α, μ, π, σ)<br><u>Cys</u> (ω)<br><u>Ser</u> (κ, θ, ζ)<br><u>Arg</u> (микросомальные GST)                                                                                                                                                       | <u>Sec</u> -X-X-Thr (GPx1,2,3,4,6)<br><u>Cys</u> -X-X-Thr (GPx5,7,8)                                                                                                                                                                        |

Окончание таблицы

| Свойства                                                                                                 | Trx                                                                                                      | Prx                                                                                                                                     | GST                                                                                                                                          | GPx                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Субстрат восстановитель                                                                                  | (Trx1,2) – GSH                                                                                           | (Prx1-6) – GSH                                                                                                                          | GSH                                                                                                                                          | (GPx1,3,4,7,8) – GSH<br>(GPx2,5,6) – ?                                                                                       |
| Фермент восстановитель                                                                                   | TrxR                                                                                                     | Trx, πGST, ERp46, Grx, PDI                                                                                                              | –                                                                                                                                            | Trx, Grx, PDI                                                                                                                |
| Субстрат окислитель                                                                                      | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>ONOO <sup>–</sup>                                                       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Prx1–6)<br>ONOO <sup>–</sup> (Prx2,5,6)<br>ROOH (Prx1–6)<br>LOOH (Prx6)<br>PLOOH (Prx6)                  | RX – ксенобиотики<br>ROOH (α, μ, κ, θ...)<br>LOOH (α, μ, κ, θ...)<br>RCH <sub>2</sub> ONO <sub>2</sub> (α...)<br>RCH <sub>2</sub> SCN (α...) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (GPx1–8)<br>ONOO <sup>–</sup> (GPx1,4)<br>ROOH (GPx1,3,4)<br>LOOH (GPx1,3,4)<br>PLOOH (GPx3,4) |
| Скорость пероксидазной реакции (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                                          | ~ 10 <sup>3</sup> M <sup>–1</sup> ·с <sup>–1</sup> –10 <sup>5</sup> M <sup>–1</sup> ·с <sup>–1</sup>     | ~ 10 <sup>5</sup> –10 <sup>8</sup> M <sup>–1</sup> ·с <sup>–1</sup>                                                                     | ~ 10 <sup>5</sup> –10 <sup>6</sup> M <sup>–1</sup> ·с <sup>–1</sup>                                                                          | ~ 10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup> M <sup>–1</sup> ·с <sup>–1</sup>                                                          |
| Константы Михаэлиса для H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                    | 10–100 мкМ                                                                                               | 90–200 мкМ                                                                                                                              | >3 мМ                                                                                                                                        | 10 мкМ–500 мкМ                                                                                                               |
| Константы Михаэлиса для ROOH                                                                             | 6–20 мкМ                                                                                                 | 80–120 мкМ                                                                                                                              | 0,05–3 мМ                                                                                                                                    | 0,05–1 мМ                                                                                                                    |
| Количество белков партнеров (диапазон) ( <a href="https://thebiogrid.org/">https://thebiogrid.org/</a> ) | 130–233                                                                                                  | 130–240                                                                                                                                 | 3–148                                                                                                                                        | 3–51                                                                                                                         |
| Участие в сигнальных путях                                                                               | ASK-1/AP-1, ERK, NF-κB, p53, ASK1/JNK/p38, KEAP1/Nrf2, MST1/FOXO3, PI3K, HIF1α, PI3K/PTEN/Akt/mTOR и др. | TLR4/NF-κB, ASK-1/AP-1, APE1/Ref-1, KEAP1/Nrf2, MST1/FOXO3, c-Jun/πGST, ERK/cyclin D1, JAK2/STAT3, JNK/p38, ERK1/2, HIF1α, C/EBPβ и др. | KEAP1/Nrf2, PI3K/AKT, HIF1α, ASK1/JNK/p38, MST1/FOXO3                                                                                        | ASK-1/AP-1, KEAP1/Nrf2, PI3K/AKT/mTOR, NF-κB и др.                                                                           |
| Ссылки                                                                                                   | [41, 50–54]                                                                                              | [55–59]                                                                                                                                 | [60–63]                                                                                                                                      | [64–68]                                                                                                                      |

Принятые сокращения: Trx – тиоредоксинов, Prx – пероксиредоксинов, GST – глутатион-S-трансфераз, GPx – глутатион-пероксидаз.

для всех пероксиредоксинов аминокислотными остатками: Pro44, Thr48 и Arg127 (нумерация для Prx1). Также как и все Trx-подобные ферменты, Prx имеют консервативную пространственную структуру – тиоредоксиновую укладку (рис. 1).

По аналогии с тиоредоксинами, в ходе эволюции от бактерий и простейших одноклеточных до многоклеточных организмов происходило увеличение числа изоформ Prx. Так, у бактерий обнаружено 3 изоформы, у дрожжей – 5, у животных – 6, а у растений – 9 изоформ пероксиредоксинов. Вероятно, увеличение в клетке количества компартментов, различающихся по спектрам образующихся гидропероксидов, привело к специализации пероксиредоксинов (к определенным видам пероксидов) и, соответственно, к росту числа изоформ Prx.

Эффективность катализа Prx ниже, чем у каталазы или селен-содержащих глутатионпероксидаз, и находится в диапазоне ~ 10<sup>5</sup>–10<sup>8</sup> M<sup>–1</sup>·с<sup>–1</sup> [70].

Следует отметить, что в нормальных условиях концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> внутри клеток редко превышает 1–5 мкМ, при развитии патологических процессов она достигает 150 мкМ, а при концентрации свыше 200 мкМ вызывает апоптоз и некроз клеток [38]. Prx1–6 проявляют максимальную активность именно в вышеуказанных микромолярных концентрациях гидропероксидов, т.к. значения кажущихся констант Михаэлиса (appr.  $K_m$ ) находятся в пределах 15–200 мкМ [71]. В то же время каталаза, миелопероксидаза и большинство глутатионпероксидаз максимальную активность проявляют в миллимолярных концентрациях (appr.  $K_m$  ~ 10–100 мМ) перекисных субстратов [72]. Пероксиредоксины обладают достаточно широкой субстратной специфичностью: Prx1–6 способны восстанавливать различные неорганические (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пероксинитрит) и органические (алкилгидропероксиды, пероксиды фосфолипидов и т.д.) гидропероксиды,

благодаря чему они играют важную роль в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Основные характеристики Prx представлены в табл. 2.

В каталитическом цикле пероксиредоксинов можно выделить три этапа: 1) окисление пероксидазного остатка цистеина, 2) образование внутримолекулярной или межмолекулярной дисульфидной связи, 3) восстановление каталитического цистеина. Схема каталитического цикла Prx представлена на рис. 2, *а–в*. В ходе восстановления перекисного субстрата тиольная группа (SH-) пероксидазного цистеина  $C_p$  обратимо окисляется до сульфеновой кислоты (SOH-). В зависимости от концентрации пероксида, окисление сульфеновой кислоты ( $C_p$ -SOH) может происходить ещё дальше — до сульфиновой ( $C_p$ -SO<sub>2</sub>H) и сульфоновой ( $C_p$ -SO<sub>3</sub>H) кислот [59]. Окисленный пероксидазный остаток цистеина ( $C_p$ -SOH) с участием глутатиона и тиоредоксина (см. выше) восстанавливается до реакционноспособной формы  $C_p$ -SH. При этом восстановление сульфиновой кислоты  $C_p$ -SO<sub>2</sub>H типичных 2-Cys-Prx до  $C_p$ -SOH осуществляется сульфоредаксинами (Srx) или сестринами (SESN) с затратой энергии АТФ [73, 74]. Состояние  $C_p$ -SO<sub>3</sub>H является необратимо окисленным. Понимание механизма восстановления  $C_p$ -SOH позволило разделить 2-Cys-Prx на типичные и атипичные. Атипичные 2-Cys-Prx (Prx5) образуют внутримолекулярную связь в пределах одной полипептидной цепи, что по механизму катализа больше остальных сближает их с тиоредоксинами. С этой точки зрения, можно предположить, что Prx5 является наиболее древним представителем семейства пероксиредоксинов. Вероятно, из атипичных 2-Cys-возникли типичные 2-Cys-пероксиредоксины (Prx1–Prx4), которые в ходе восстановления  $C_p$ -SOH стали образовывать межмолекулярные дисульфидные связи между пероксидажным остатком цистеина ( $C_p$ ) одной молекулы и восстанавливающим цистеином ( $C_R$ ) другой. Образовавшиеся межмолекулярные или внутримолекулярные дисульфидные связи 2-Cys-Prx восстанавливаются с участием Trx и GSH. В случае 1-Cys-пероксиредоксинов (Prx6) образуется дисульфидная связь с GSH, опосредованная глутатион-S-трансферазой ( $\pi$ GST) [75]. Вероятно, утрата восстанавливающего остатка ( $C_R$ ) у Prx6 в ходе эволюции произошла вторично, а механизм катализа 1-Cys-пероксиредоксинов является наиболее поздним.

Особенности кинетики каталитического процесса Prx1–6 таковы, что из-за более медленного восстановления сульфеновой кислоты ( $C_p$ -SOH) по сравнению с кинетикой окисле-

ния  $C_p$ -SH, происходит накопление окисленных пероксиредоксинов  $C_p$ -SOH в клетке [59]. В ходе восстановления окисленного цистеина ( $C_p$ -SOH) Prx могут образовывать межмолекулярные дисульфидные связи не только с белками-восстановителями (Trx1, Trx2, PDI (ERp46),  $\pi$ GST), но и с другими тиол-содержащими белками (транскрипционными факторами, киназами, фосфатазами, рецепторами, ионными каналами и др.), тем самым модулируя их активность и оказывая влияния на многие клеточные процессы [39, 58].

Кроме пероксидазной функции, Prx проявляют шаперонную, фосфолипазную и сигнально-регуляторную активность. Изменение степени окисления пероксидазного цистеина в активном центре пероксиредоксинов влияет на их физико-химические свойства и функцию в клетке [76]. Окисление цистеина в молекуле типичных 2-Cys-Prx (Prx1–Prx4) приводит к изменению конформации белков и образованию кольцеобразных олигомерных структур (тороидов), обладающих шаперонной активностью. Благодаря шаперонной активности, типичные 2-Cys-Prx препятствуют агрегации белков и способствуют восстановлению их нативной структуры, обеспечивая выживание клетки в условиях окислительного стресса [55]. Окисление 1-Cys-Prx (Prx6) приводит к активации Ca<sup>2+</sup>-независимой фосфолипазы A<sub>2</sub> (iPLA2), которая в норме проявляется только в кислых условиях (в лизосомах и ламеллярных телах, при pH 4–5) и играет важную роль в метаболизме фосфолипидов и передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов [77]. Кроме того, экстраклеточные формы Prx проявляют иммуномодулирующие и сигнально-регуляторные свойства, опосредованные Toll-подобными рецепторами [78, 79].

Физиологическое значение пероксиредоксинов было продемонстрировано на нокаутных по этим генам мышах. Нокаут по гену *PRDX1* приводит к гемолитической анемии, увеличению окислительных повреждений тканей, возрастанию числа злокачественных опухолей. Нокаут по гену *PRDX2* приводит к повреждению эритроцитов, патологии селезёнки и развитию анемии. Нокаут по гену *PRDX3* приводит к уменьшению массы тела. Нокаут по гену *PRDX4* приводит к атрофии тестикул, олигозооспермии и повышению чувствительности сперматогенных клеток к окислительным воздействиям. Нокаут по гену *PRDX6* приводит к повышенному уровню окислительных повреждений белков, тканей и органов, несмотря на нормальный уровень экспрессии генов других антиоксидантных ферментов [80]. Экспериментов по нокауту гена *PRDX5* на животных не проводилось, однако

эксперименты на беспозвоночных указывают на его важную роль в иммунном ответе [81]. Таким образом, пероксиредоксины являются важной составляющей антиоксидантной и сигнально-регуляторной системы организма.

**Глутатионпероксидазы.** В отличие от пероксиредоксинов (в активном центре которых содержится 1 или 2 остатка Cys) многие глутатионпероксидазы (GPx) являются селен-содержащими белками. Считается, что замена серы на селен в активном центре GPx связана с тем, что Sec имеет более низкую, чем у Cys, константу диссоциации ( $pK_a = 5,47$ ) и более высокий восстановительный потенциал. Из-за химических свойств селена при физиологическом значении pH в белках обычно присутствует Sec в виде селенолята ( $-Se^-$ ). Селенолят намного более реакционноспособен, чем тиолаты, что обеспечивает селен-содержащим ферментам высокую каталитическую эффективность. Необходимо отметить, что к селен-содержащим белкам также относятся некоторые тиоредоксинредуктазы (TrxR), входящие в состав антиоксидантной системы. В частности, Trx и TrxR участвуют в регенерации пероксиредоксинов [82].

Несомненно, что по сравнению с тиол-содержащими оксидоредуктазами, селен-содержащие GPx являются эволюционно более поздними ферментами, т.к. для их биосинтеза было необходимо создать специальные системы транскрипции и трансляции, включающие SECIS — элемент в мРНК (для кодирования Sec вместо стоп-кодона UGA), а также синтез специальной тРНК, несущей Sec [83]. Глутатионпероксидазы широко представлены в живом мире (от простейших до человека), причём обнаружены как селен-содержащие, так и цистеин-содержащие изоформы. Следует отметить, что в ходе эволюции живых организмов происходило увеличение числа селен-содержащих белков. Известно, что только ~20% прокариот используют Sec в своих белках, тогда как ~50% эукариот используют Sec в своих ферментах [84]. У человека обнаружено 8 глутатионпероксидаз (GPx1–8), из которых 5 изоформ (GPx1–4 и GPx6) содержат в активном центре селеноцистеин. Согласно филогенетическому анализу, семейство GPx состоит из трёх эволюционных групп, происходящих от общего Cys-содержащего предка: 1) GPx1/GPx2, 2) GPx3/GPx5/GPx6 и 3) GPx4/GPx7/GPx8. Cys-содержащие GPx7 и GPx8 произошли от GPx4-подобных предков. GPx5 и GPx6, по-видимому, являются результатом tandemной дупликации GPx3. GPx1 и GPx2 являются эволюционным ответвлением GPx3, GPx5 и GPx6 [85]. По структуре все GPx имеют тиоредоксиную укладку (рис. 1, в) и в основном представ-

ляют собой гомотетрамерные протеины, за исключением GPx4, которая является мономерным белком.

Глутатионпероксидазы имеют различную внутриклеточную и тканевую специфичность, что, вероятно, связано со «специализацией» каждой из изоформ для восстановления различных гидропероксидов. GPx1 локализована в цитоплазме и митохондриях почти во всех клетках. GPx2 обнаружена в эпителии кишечника и выполняет важную антиоксидантную функцию. GPx3 секретируется эпителием почечных канальцев в кровь, а снижение её уровня/активности приводит к росту тромбозов. Изоформа GPx4 экспрессируется практически во всех тканях млекопитающих, связана с мембраной митохондрий и защищает их от окислительного повреждения. GPx5 является секреторным белком придатка яичек и участвует в защите созревающих сперматозоидов от АФК. GPx6 обнаружена в обонятельном эпителии и, предположительно, играет важную роль в метаболизме одорантов. Примечательно, что GPx6 человека и свиньи в активном центре содержит селеноцистеин, в то время как GPx6 мыши и крысы содержит цистеин. GPx7 и GPx8 — относительно недавно открытые изоформы цистеин-содержащих глутатионпероксидаз эндоплазматического ретикулума, где они в комплексе с дисульфидизомеразой (PDI) и Trx участвуют в дитиол-дисульфидном обмене, препятствуя агрегации белков [86].

Для GPx характерна высокая пероксидазная активность и более эффективный механизм катализа по сравнению с тиоредоксинами и пероксиредоксинами. Глутатионпероксидазы восстанавливают пероксид водорода или органические гидропероксиды до воды или соответствующих спиртов, используя в качестве донора электронов восстановленный глутатион. Наличие селеноцистеина в активном центре глутатионпероксидаз обеспечивает им эффективную элиминацию гидропероксидов с константой скорости  $\sim 10^7\text{--}10^8\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , при этом максимальная активность этих ферментов проявляется в широком диапазоне концентраций пероксидов [87]. Рекомбинантные GPx с заменой Sec на Cys имеют пероксидазную активность на 2–3 порядка ниже. Основные характеристики глутатионпероксидаз представлены в табл. 2. В каталитическом цикле глутатионпероксидаз, как и в случае рассмотренных ранее семейств оксидоредуктаз, различают 3 этапа: 1) окисление пероксидазного остатка селеноцистеина ( $-SeOH$ ), 2) образование межмолекулярной дисульфидной связи с молекулой глутатиона ( $Se-SG$ ), 3) восстановление  $Se-SG$  второй молекулой GSH до активного

селеноцистеина (-SeH). Элиминация пероксидов глутатионпероксидазами происходит по механизму «пинг-понг» с участием двух субстратов: окислителя (пероксида/гидропероксида) и восстановителя (GSH) [68].

При исследовании GPx1 было показано наличие трёх аминокислот вблизи каталитического центра, которые обеспечивают связывание GSH. Взаимодействие GPx1 с пероксидом водорода приводит к окислению группы -Se-H в активном сайте фермента до -Se-OH, после чего фермент восстанавливается одной молекулой глутатиона GSH (находящейся рядом) с образованием промежуточного продукта -Se-SG. Вторая молекула глутатиона взаимодействует со связью -Se-SG, что приводит к восстановлению селеноцистеина глутатионпероксидазы (-Se-H) и окислению глутатиона (GSSG). Окисленный GSSG восстанавливается NADPH-зависимой глутатионредуктазой (GR) до двух молекул GSH и вновь включается в каталитический цикл. Схема каталитического цикла селен-содержащих GPx представлена на рис. 2. Каталитический цикл цистеин-содержащих глутатионпероксидаз (NS-GPx) напоминает каталитический цикл 2-Cys-пероксиредоксинов с участием Trx и GSH в качестве восстановителей, что ещё раз подтверждает генетическую связь этих семейств.

При недостатке селена в рационе питания уменьшается уровень GPx, что снижает устойчивость организмов к окислительному стрессу и может приводить к развитию свободнорадикальных патологий. У человека снижение активности GPx1 в результате дефицита селена выявлено при сердечно-сосудистых заболеваниях и при раке [88]. Снижение активности GPx7 способствует онкотрансформации клеток и развитию злокачественных опухолей молочной железы [89]. Физиологическая роль некоторых GPx была продемонстрирована в экспериментах по нокауту соответствующих генов мыши. Так, мыши, нокаутные по одной копии гена *GPX1*, имеют нормальный фенотип и нормальную продолжительность жизни, однако у мышей, нокаутных по обеим копиям этого гена, преждевременно развивается катаракта и наблюдаются дефекты в пролиферации вспомогательных мышечных клеток. Повышенная экспрессия гена *GPX1*, защищает мышей от развития окислительного стресса, однако у таких животных развивается гипергликемия, резистентность к инсулину и ожирение [68]. У мышей с нокаутом гена *GPX2* наблюдается воспаление слизистой оболочки кишечника, особенно при дефиците селена в рационе [65]. Мыши, нокаутные по гену митохондриальной и ядерной изоформы *GPX4*, погибают в раннем эмбриогенезе,

в то время как нокаут по гену цитоплазматической изоформы *GPX4* не приводит к таким фатальным последствиям [64, 67]. Нокаут *GPX5* приводит к появлению дефектов в общем развитии и отклонению развития зрительной системы у потомства, полученного от самцов с нокаутом по этому гену [66].

Таким образом, глутатионпероксидазы являются важными антиоксидантными ферментами, регулирующими окислительно-восстановительный гомеостаз, клеточную сигнализацию, апоптоз и дифференцировку клеток.

**Глутатион-S-трансферазы.** Еще одним важным представителем гидропероксид-восстанавливающей системы клетки являются глутатион-S-трансферазы (GST), которые также имеют тиоредоксиновую укладку и относятся к Trx-подобным белкам. GST участвуют в начальной стадии детоксикации гидрофобных ксенобиотиков (RX), связывая их с GSH, вследствие чего они делаются более водорастворимыми и после сложных ферментативных превращений в меркаптураты выводятся из организма:  $RX + GSH \rightarrow GSR + HX$  [90]. Благодаря функции GST клетки приобретают устойчивость к антибиотикам, гербицидам, инсектицидам и химиопрепаратам. В частности, повышенная экспрессия GST обнаружена в различных раковых клетках, имеющих лекарственную устойчивость [63]. Помимо функции детоксикации, GST играют важную роль в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать органические гидропероксиды до спиртов, используя GSH в качестве субстрата — восстановителя (см. ниже). При этом GST не имеют характерного для других Trx-подобных белков дитиольного мотива (Cys-x-x-Cys) в каталитическом центре. Важные для S-глутатионилирования аминокислотные остатки располагаются в так называемой «каталитической петле», находящейся после первого  $\beta$ -стренда в тиоредоксин-подобном домене GST (рис. 1).

Глутатион-S-трансферазы широко представлены в живом мире: от бактерий до растений и животных. GST представляют из себя весьма гетерогенное семейство ферментов, с большим количеством изоформ (табл. 2), которые сильно различаются по субстратной специфичности и активности, что связано с процессами дупликации генов, генетической рекомбинацией и накоплением мутаций в ходе эволюции. Для некоторых членов GST функциональная неоднородность дополнительно увеличивается за счёт альтернативного сплайсинга и точечных мутаций (полиморфизм генов), что приводит к изменению субстратной специфичности новой изоформы GST. Присутствие большого количества

изоформ ферментов GST эволюционно связано с адаптацией к различным внешним условиям [62].

Все GST состоят из двух доменов: общего для всех изоформ консервативного *N*-концевого (GSH-связывающего) и варибельного *C*-концевого (для связывания субстратов). Классификация GST основана на различиях в аминокислотной последовательности *C*-концевого домена. По субклеточной локализации и последовательности *C*-концевого домена GST делят на несколько подсемейств. У человека цитозольные GST состоят из 7 подсемейств, митохондриальные GST включают одно подсемейство, а мембраносвязанные GST состоят из 6 подсемейств [62]. Основные характеристики глутатион-S-трансфераз представлены в табл. 2.

Как отмечалось ранее, GST являются важными ферментами антиоксидантной защиты. Показано, что отдельные изоформы GST способны в присутствии GSH восстанавливать некоторые классы органических соединений, таких как нитраты ( $\text{RCH}_2\text{ONO}_2$ ) и изотиоцианаты ( $\text{RCH}_2\text{SCN}$ ), а также гидропероксиды длинноцепочечных жирных кислот — LOOH [90]. Реакция в этом случае протекает в две стадии [91], поскольку фермент катализирует только восстановление молекулы липопероксида:



а дальнейшее окисление ещё одной молекулы GSH осуществляется спонтанно (неферментативно):



Как нетрудно убедиться, суммарная реакция полностью тождественна реакции, катализируемой глутатионпероксидазами:



Нами впервые было установлено [92, 93], а позднее подтверждено и другими авторами [94, 95], что GST, подобно мономерной GPx, способны восстанавливать LOOH-ацилы окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах без их предварительного фосфолипазного гидролиза. Более того, было показано, что сами GST ингибируются продуктами фосфолипазного гидролиза — длинноцепочечными свободными жирными кислотами, тогда как цитозольная Se-содержащая GPx, напротив, была абсолютно резистентна к действию свободных жирных кислот [96]. Исходя из полученных результатов можно предположить, что в нормальных физиологических условиях, когда фосфолипаза  $A_2$  ма-

лоактивна, контроль за уровнем LOOH в биомембранах осуществляется преимущественно глутатион-S-трансферазами, способными напрямую восстанавливать мембранные LOOH. При патологии же (например, при ишемии) создаются условия (ацидоз, выход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и др.) для активации фосфолипазы  $A_2$ , что должно сопровождаться подавлением активности GST вследствие накопления свободных жирных кислот и включением в процесс детоксикации LOOH цитозольных GPx, нечувствительных к действию продуктов фосфолипазного гидролиза. В то же время фосфолипаза  $A_2$  гидролизует преимущественно окисленные жирнокислотные остатки фосфолипидов [97, 98], переводя их в гидропероксиды свободных жирных кислот, являющиеся субстратом Se-содержащих GPx, что подтверждает важную роль ферментативного гидролиза в репарации биомембран после СР-повреждения. Таким образом, фосфолипаза  $A_2$ , обеспечивая доступность окисленных жирнокислотных остатков мембранных фосфолипидов для восстановления цитозольными глутатионпероксидазами, принимает самое непосредственное участие в регуляции процессов СР-окисления липидов в клетке. Было установлено, что предпочтительными субстратами Se-содержащей GPx из бычьих эритроцитов являются гидрофильные и нуклеофильные органические гидропероксиды с низким молекулярным весом, а также  $\text{H}_2\text{O}_2$ , тогда как предпочтительными субстратами неселеновой GST из печени свиньи были липофильные и электрофильные гидропероксиды с большим углеводородным радикалом [99]. Оба фермента эффективно восстанавливают гидропероксиды полиеновых жирных кислот, но GST, неспособная восстанавливать  $\text{H}_2\text{O}_2$ , достаточно эффективно восстанавливает LOOH-ацилы ненасыщенных фосфолипидов в биомембранах без их предварительного гидролиза фосфолипазой  $A_2$  [98–100].

Кроме непосредственного участия в восстановлении гидропероксидов, для некоторых изоформ GST показано опосредованное участие в антиоксидантной защите. Например, GST $\pi$  восстанавливает окисленный пероксидазный остаток цистеина 1-Cys-пероксиредоксинов (рис. 2), тем самым являясь восстановителем в каталитическом цикле Ptxb человека. Окисленные формы катехоламинов, способствующие образованию супероксидного анион-радикала, являются субстратами GST. Конъюгация таких соединений с глутатионом препятствует избыточной продукции  $\text{O}_2^{\cdot-}$  и способствует нормализации редокс-статуса клеток [101].

Кроме детоксикации ксенобиотиков, антиоксидантной функции, GST являются регулято-

рами внутриклеточных сигналов за счёт белок-белковых взаимодействий с киназами и транскрипционными факторами (табл. 2). Например, *GSTA1-1* и *GSTP1-1* взаимодействуют с киназой JNK1 (участвующей в запуске апоптоза), препятствуя её активации в нормальных условиях. С ростом уровня АФК в клетке комплексы JNK1 и *GSTA1-1/GSTP1-1* распадаются, что приводит к запуску апоптоза. Аналогичная ситуация показана для *GSTM1-1* и проапоптогической киназы ASK1. Глутатион-S-трансферазы путём глутатионилирования (по остаткам Cys) принимают участие в регуляции работы серин/треониновых AMP-активируемых протеинкиназ (AMPK), которые играют ключевую роль в контроле энергетического баланса клетки. Кроме того, GST влияют на активность регуляторных белков опосредованно через регуляцию уровня продуктов перекисного окисления липидов (акролеин, 4-гидрокси-ноненаль), влияющих на активность циклин-зависимых киназ [60].

Физиологическая роль некоторых глутатион-S-трансфераз показана на животных моделях с нокаутом соответствующих генов: *GSTA3*, *GSTA4*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTO1* и *GSTS1*. Нокаут указанных генов по отдельности не приводит к каким-либо серьезным изменениям фенотипа и фертильности у мышей, однако у таких животных существенно повышается чувствительность ко многим ксенобиотикам [61]. Например, мыши, нокаутные по гену *GSTP1-1*, оказались более чувствительными к нейротоксину 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридину (MPTP), что приводило к раннему появлению дегенерации дофаминергических нейронов и волокон полосатого тела головного мозга [102]. Нокаут *GSTT1* у мышей также приводил к повышенной чувствительности к 1,2-эпокси-3-п-нитрофенокси-пропану (EPNP), дихлорметану (DCM) и 1,3-бис (2-хлорэтил)-1-нитрозомочевине (BCNU) [61, 103]. Гомозиготные делеции генов *GSTM1* и *GSTT1* обнаружены у людей, что приводит к снижению общей GST-активности в их тканях. Для делеции *GSTT1* человека показана связь с лейко- и нейтропенией. Кроме того, предполагают, что гомозиготные по этим делециям люди подвержены повышенному риску злокачественных новообразований из-за снижения способности детоксицировать канцерогены [102, 104].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пероксиредоксины (Prx), глутатионпероксидазы (GPx) и глутатион-S-трансферазы (GST) — филогенетически близкие семейства ферментов, которые являются важнейшими ре-

гуляторами окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Указанные семейства ферментов способны нейтрализовать широкий спектр неорганических и органических пероксидов. По эффективности пероксидазной активности Prx и GST уступают GPx. Пероксиредоксины, будучи предшественниками GPx, эволюционно являются более древними белками. Однако в ходе своей эволюции Prx приобрели дополнительные функции в клетке. Например, 2-Cys-пероксиредоксины (Prx1–4) благодаря шаперонной активности предотвращают агрегацию белков в клетке в условиях окислительного и температурного стресса. Наличие фосфолипидной активности у Prx6 позволяет этому ферменту участвовать в метаболизме фосфолипидов мембран клеток, а также в регуляции дифференцировки, миграции и гибели клеток. Способность образовывать межмолекулярные дисульфидные связи с важнейшими регуляторными белками (транскрипционными факторами, рецепторами) позволяет Prx опосредованно влиять на все основные клеточные процессы. Глутатион-S-трансферазы — это наиболее многофункциональные тиоредоксин-подобные белки. Они являются важнейшими ферментами детоксикации ксенобиотиков, регуляторами внутриклеточной сигнализации, и, кроме того, они участвуют в элиминации многих гидропероксидов (в особенности, липидной природы). Глутатионпероксидазы, в отличие от Prx и GST, являются эволюционно более поздними и наиболее специализированными ферментами. Благодаря селеноцистеину в активном центре GPx относятся к наиболее эффективным пероксидазам, утилизирующим различные перекисные субстраты, что делает их незаменимыми элементами антиоксидантной защиты. Пероксиредоксины, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы являются ярким примером молекулярной эволюции тиоредоксин-подобных белков, функции которых тесно взаимосвязаны, но до сих пор до конца не исследованы.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-14-50114).

**Благодарности.** Авторы благодарят проф. д.б.н. В.И. Новоселова за ценные замечания при подготовке рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

1. Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. (2006) *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Слово, Москва, с. 556.
2. Hernansanz-Agustín, P., and Enríquez, J. A. (2021) Generation of reactive oxygen species by mitochondria, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 415, doi: 10.3390/antiox10030415.
3. Chernyak, B. V., Izyumov, D. S., Lyamzaev, K. G., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., et al. (2006) Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1757**, 525-534, doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.02.019.
4. McCord, J. M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am. J. Med.*, **108**, 652-659.
5. Brand, M. D. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 14-31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
6. Crapo, J. D., and Tierney, D. F. (1974) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity, *Am. J. Physiol.*, **226**, 1401-1407.
7. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., and Victor, V. M. (2016) Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 1245049, doi: 10.1155/2016/1245049.
8. Halliwell, B. (2020) Reflections of an aging free radical, *Free Radic. Biol. Med.*, **161**, 234-245, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.010.
9. Vladimirov, Y. A., and Proskurnina, E. V. (2009) Free radicals and cell chemiluminescence, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1545-1566, doi: 10.1134/S0006297909130082.
10. Bruskov, V. I., Karp, O. E., Garmash, S. A., Shtarkman, I. N., Chernikov, A. V., and Gudkov, S. V. (2012) Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action, *Free Radic. Res.*, **46**, 1280-1290, doi: 10.3109/10715762.2012.709316.
11. Soodaeva, S. K., Klimanov, I. A., and Nikitina, L. Y. (2017) Nitrosative and oxidative stresses in respiratory diseases, *Pulmonologiya*, **27**, 262-273, doi: 10.18093/0869-0189-2017-27-2-262-273.
12. Schöneich, C. (2019) Thiyl radical reactions in the chemical degradation of pharmaceutical proteins, *Molecules*, **24**, 4357, doi: 10.3390/molecules24234357.
13. Panov, A. (2018) Perhydroxyl radical ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) as inducer of the isoprostane lipid peroxidation in mitochondria, *Mol. Biol. (Mosk)*, **52**, 347-359, doi: 10.7868/S0026898418030011.
14. Osipov, A. N., Borisenko, G. G., and Vladimirov, Y. A. (2007) Biological activity of hemoprotein nitrosyl complexes, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1491-1504, doi: 10.1134/S0006297907130068.
15. Collin, F. (2019) Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2407, doi: 10.3390/ijms20102407.
16. Dutton, A. S., Fukuto, J. M., and Houk, K. N. (2005) Theoretical reduction potentials for nitrogen oxides from CBS-QB3 energetics and (C)PCM solvation calculations, *Inorg. Chem.*, **44**, 4024-4028, doi: 10.1021/ic048734q.
17. Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th Edn., N. Y., W H Freeman.
18. Panasenkov, O. M., Torkhovskaya, T. I., Gorudko, I. V., and Sokolov, A. V. (2020) The Role of halogenative stress in atherogenic modification of low-density lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **85** (Suppl 1), 34-55, doi: 10.1134/S0006297920140035.
19. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2019) Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins, *Chem. Rev.*, **119**, 2043-2086, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00554.
20. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
21. Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dyballa-Rukes, N., McNamara, C. A., and Altschmied, J. (2017) Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 679-699, doi: 10.1089/ars.2016.6946.
22. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., and Griending, K. K. (2018) Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling, *Circ. Res.*, **122**, 877-902, doi: 10.1161/circresaha.117.311401.
23. Hoffmann, M. H., and Griffiths, H. R. (2018) The dual role of reactive oxygen species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models, *Free Radic. Biol. Med.*, **125**, 62-71, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016.
24. Cadet, J., and Davies, K. J. A. (2017) Oxidative DNA damage & repair: an introduction, *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 2-12, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030.
25. Chernikov, A. V., Gudkov, S. V., Usacheva, A. M., and Bruskov, V. I. (2017) Exogenous 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: biomedical properties, mechanisms of action, and therapeutic potential, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1686-1701, doi: 10.1134/S0006297917130089.
26. Chao, M. R., Evans, M. D., Hu, C. W., Ji, Y., Möller, P., et al. (2021) Biomarkers of nucleic acid oxidation – a summary state-of-the-art, *Redox Biol.*, **42**, 101872, doi: 10.1016/j.redox.2021.101872.
27. Poetsch, A. R. (2020) The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 207-219, doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.013.
28. Davies, M. J. (2016) Protein oxidation and peroxidation, *Biochem. J.*, **473**, 805-825, doi: 10.1042/BJ20151227.
29. Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., and Höhn, A. (2021) Protein oxidation – formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases, *Redox Biol.*, **42**, 101901, doi: 10.1016/j.redox.2021.101901.
30. Lankin, V. Z., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Kurganov, B. I. (2017) Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **475**, 287-290, doi: 10.1134/S1607672917040123.
31. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kononova, G. G., and Kozachenko, A. I. (1999) Concentration-dependent inversion of antioxidant and prooxidant effects of  $\beta$ -carotene in tissues *in vivo*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **128**, 930-932, doi: 10.1007/bf02438088.
32. Braakman, R. (2019) Evolution of cellular metabolism and the rise of a globally productive biosphere, *Free Radic. Biol. Med.*, **140**, 172-187, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.004.
33. Ittarat, W., Sato, T., Kitashima, M., Sakurai, H., Inoue, K., and Seo, D. (2021) Rubredoxin from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* donates a redox equivalent to the flavodiiron protein in an NAD(P)H dependent manner via ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreductase, *Arch. Microbiol.*, **203**, 799-808, doi: 10.1007/s00203-020-02079-4.
34. Ding, H., and Demple, B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the

- SoxR transcription activator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5146-5150, doi: 10.1073/pnas.97.10.5146.
35. Case, A. J. (2017) On the origin of superoxide dismutase: an evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling, *Antioxidants (Basel)*, **6**, 82, doi: 10.3390/antiox6040082.
  36. Zorov, D. B., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., Bakeeva, L. E., Zorov, S. D., et al. (2020). Nonphosphorylating oxidation in mitochondria and related processes, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1570-1577, doi: 10.1134/S0006297920120093.
  37. Lankin, V. Z., Vandyshev, D. B., Tikhaze, A. K., Kosykh, V. A., and Pomoinetskii, V. D. (1981) Effect of hyperoxia on superoxide dismutase and glutathione lipoperoxidase activity in mouse tissues, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **259**, 229-231.
  38. Schröder, E., and Eaton, P. (2008) Hydrogen peroxide as an endogenous mediator and exogenous tool in cardiovascular research: issues and considerations, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**, 153-159, doi: 10.1016/j.coph.2007.12.012.
  39. Rhee, S. G., Woo, H. A., and Kang, D. (2018) The role of peroxiredoxins in the transduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signals, *Antioxidants Redox Signal.*, **28**, 537-557, doi: 10.1089/ars.2017.7167.
  40. Olson, K. R. (2020) Reactive oxygen species or reactive sulfur species: why we should consider the latter, *J. Exp. Biol.*, **223**, jeb196352, doi: 10.1242/jeb.196352.
  41. Lu, J., and Holmgren, A. (2014) The thioredoxin antioxidant system, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 75-87, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
  42. Balsera, M., and Buchanan, B. B. (2019) Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **140**, 28-35, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
  43. Ingles-Prieto, A., Ibarra-Molero, B., Delgado-Delgado, A., Perez-Jimenez, R., Fernandez, J. M., et al. (2013) Conservation of protein structure over four billion years, *Structure*, **21**, 1690-1697, doi: 10.1016/j.str.2013.06.020.
  44. Johansson, L., Gafvelin, G., and Arnér, E. S. J. (2005) Selenocysteine in proteins – properties and biotechnological use, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1726**, 1-13, doi: 10.1016/j.bbagen.2005.05.010.
  45. Atkinson, H. J., and Babbitt, P. C. (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold, *Biochemistry*, **48**, 11108-11116, doi: 10.1021/bi901180v.
  46. Pan, J. L., and Bardwell, J. C. A. (2006) The origami of thioredoxin-like folds, *Protein Sci.*, **15**, 2217-2227, doi: 10.1110/ps.062268106.
  47. Modi, T., Huihui, J., Ghosh, K., and Ozkan, S. B. (2018) Ancient thioredoxins evolved to modern day stability-function requirement by altering native state ensemble, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **373**, 20170184, doi: 10.1098/rstb.2017.0184.
  48. Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., and Powis, G. (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 916-922, doi: 10.1128/MCB.23.3.916-922.2003.
  49. Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., and Maruyama, T. (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene, *Dev. Biol.*, **178**, 179-185, doi: 10.1006/dbio.1996.0208.
  50. Mitchell, D. A., Morton, S. U., Fernhoff, N. B., and Marletta, M. A. (2007) Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11609-11614, doi: 10.1073/pnas.0704898104.
  51. Qayyum, N., Haseeb, M., Kim, M. S., Choi, S. (2021) Role of thioredoxin-interacting protein in diseases and its therapeutic outlook, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2754, doi: 10.3390/ijms22052754.
  52. Benhar, M., Shytaj, I. L., Stamler, J. S., and Savarino, A. (2016) Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV, *J. Clin. Invest.*, **126**, 1630-1639, doi: 10.1172/JCI85339.
  53. Lee, S., Kim, S. M., and Lee, R. T. (2013) Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 1165-1207, doi: 10.1089/ars.2011.4322.
  54. Seco-Cervera, M., González-Cabo, P., Pallardó, F. V., Romá-Mateo, C., and García-Giménez, J. L. (2020) Thioredoxin and glutaredoxin systems as potential targets for the development of new treatments in Friedreich's ataxia, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 1257, doi: 10.3390/antiox9121257.
  55. Rhee, S. G., and Kil, I. S. (2017) Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 1-27, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014431.
  56. Luo, W., Chen, I., Chen, Y., Alkam, D., Wang, Y., and Semenza, G. L. (2016) PRDX2 and PRDX4 are negative regulators of hypoxia-inducible factors under conditions of prolonged hypoxia, *Oncotarget*, **7**, 6379-6397, doi: 10.18632/oncotarget.7142.
  57. Ma, S., Zhang, X., Zheng, L., Li, Z., Zhao, X., et al. (2016) Peroxiredoxin 6 is a crucial factor in the initial step of mitochondrial clearance and is upstream of the PINK1-Parkin pathway, *Antioxid. Redox Signal.*, **24**, 486-501, doi: 10.1089/ars.2015.6336.
  58. Sharapov, M. G., and Novoselov, V. I. (2019) Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 79-100, doi: 10.1134/S0006297919020019.
  59. Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., et al. (2018) Differential kinetics of two-cysteine peroxiredoxin disulfide formation reveal a novel model for peroxide sensing, *Biochemistry*, **57**, 3416-3424, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00188.
  60. Kalinina, E. V., Chernov, N. N., and Novichkova, M. D. (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1562-1583, doi: 10.1134/S0006297914130082.
  61. Arakawa, S. (2013) Utilization of glutathione S-transferase Mu 1- and Theta 1-null mice as animal models for absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity studies, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **9**, 725-736, doi: 10.1517/17425255.2013.780027.
  62. Mohana, K., and Achary, A. (2017) Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance, *Drug Metab. Rev.*, **49**, 318-337, doi: 10.1080/03602532.2017.1343343.
  63. Singh, R. R., and Reindl, K. M. (2021) Glutathione S-transferases in cancer, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 701, doi: 10.3390/antiox10050701.
  64. Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., et al. (2014) Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4, *Cell*, **156**, 317-331, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
  65. Esworthy, R. S., Yang, L., Frankel, P. H., and Chu, F. F. (2005) Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice, *J. Nutr.*, **135**, 740-745, doi: 10.1093/jn/135.4.740.

66. Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., et al. (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice, *J. Clin. Invest.*, **119**, 2074-2085, doi: 10.1172/JCI38940.
67. Lu, L., Oveson, B. C., Jo, Y. J., Lauer, T. W., Usui, S., et al. (2009) Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 715-724, doi: 10.1089/ars.2008.2171.
68. Brigelius-Flohé, R., and Flohé, L. (2020) Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily, *Antioxidants Redox Signal.*, **33**, 498-516, doi: 10.1089/ars.2019.7905.
69. Sharapov, M. G., Ravin, V. K., and Novoselov, V. I. (2014) Peroxiredoxins as multifunctional enzymes, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **48**, 520-545, doi: 10.1134/S0026893314040128.
70. Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2021) The enigma of 2-Cys peroxiredoxins: what are their roles? *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 84-91, doi: 10.1134/S0006297921010089.
71. Winterbourn, C. C., and Peskin, A. V. (2016) Kinetic approaches to measuring peroxiredoxin reactivity, *Mol. Cells*, **39**, 26-30, doi: 10.14348/molcells.2016.2325.
72. Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., and Ursini, F. (2011) A comparison of thiol peroxidase mechanisms, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 763-780, doi: 10.1089/ars.2010.3397.
73. Forshaw, T. E., Reisz, J. A., Nelson, K. J., Gumpena, R., Lawson, J. R., et al. (2021) Specificity of human sulfiredoxin for reductant and peroxiredoxin oligomeric state, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 946, doi: 10.3390/antiox10060946.
74. Liu, Y., Li, M., Du, X., Huang, Z., and Quan, N. (2021) Sestrin 2, a potential star of antioxidant stress in cardiovascular diseases, *Free Radic. Biol. Med.*, **163**, 56-68, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.015.
75. Fisher, A. B., Vasquez-Medina, J. P., Dodia, C., Sorokina, E. M., Tao, J.-Q., and Feinstein, S. I. (2018) Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes, *Redox Biol.*, **14**, 41-46, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.008.
76. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015) Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 435-445, doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001.
77. Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling, *Arch. Biochem. Biophys.*, **617**, 68-83, doi: 10.1016/j.abb.2016.12.003.
78. Knoop, B., Becker, S., Poncin, M. A., Glibert, J., Derclaye, S., et al. (2018) Specific interactions measured by AFM on living cells between peroxiredoxin-5 and TLR4: relevance for mechanisms of innate immunity, *Cell Chem. Biol.*, **25**, 550-559.e3, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.006.
79. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., and Novoselova, E. G. (2021) The role of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
80. Lee, Y. J. (2020) Knockout mouse models for peroxiredoxins, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 182, doi: 10.3390/antiox9020182.
81. Radyuk, S. N., and Orr, W. C. (2018) The multifaceted impact of peroxiredoxins on aging and disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1293-1311, doi: 10.1089/ars.2017.7452.
82. Nelson, K. J., Perkins, A., Van Swearingen, A. E. D., Hartman, S., Brereton, A. E., et al. (2018) Experimentally dissecting the origins of peroxiredoxin catalysis, *Antioxid. Redox Signal.*, **28**, 521-536, doi: 10.1089/ars.2016.6922.
83. Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles, *Physiol. Rev.*, **94**, 739-777, doi: 10.1152/physrev.00039.2013.
84. Gladyshev, V. N., Kryukov, G. V., Fomenko, D. E., and Hatfield, D. L. (2004) Identification of trace element-containing proteins in genomic databases, *Annu. Rev. Nutr.*, **24**, 579-596, doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132241.
85. Mariotti, M., Ridge, P. G., Zhang, Y., Lobanov, A. V., Pringle, T. H., et al. (2012) Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes, *PLoS One*, **7**, e33066, doi: 10.1371/journal.pone.0033066.
86. Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013) Glutathione peroxidases, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1830**, 3289-3303, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
87. Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1790**, 1486-1500, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.007.
88. Lubos, E., Loscalzo, J., and Handy, D. E. (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxidants Redox Signal.*, **15**, 1957-1997, doi: 10.1089/ars.2010.3586.
89. Jiao, Y., Wang, Y., Guo, S., and Wang, G. (2017) Glutathione peroxidases as oncotargets, *Oncotarget*, **8**, 80093-80102, doi: 10.18632/oncotarget.20278.
90. Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I., and Pearson, W. R. (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases, *Methods Enzymol.*, **401**, 1-8, doi: 10.1016/S0076-6879(05)01001-3.
91. Prohaska, J. R. (1980) The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases, *Biochim. Biophys. Acta*, **611**, 87-98, doi: 10.1016/0005-2744(80)90045-5.
92. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Osis, Yu. G., Vikhert, A. M., Schewe, T., and Rapoport, S. (1985) Enzymatic regulation of lipid peroxidation in the membranes: the role of phospholipase A2 and glutathione transferase, *Doklady Biochemistry*, **281**, 204-207.
93. Bondar, T. N., Lankin, V. Z., and Antonovsky, V. L. (1989) The reduction of organic hydroperoxides by glutathione peroxidase and glutathione S-transferase: the influence of substrate structure, *Doklady Biochemistry*, **304**, 217-220.
94. Awasthi, Y. C., Zimniak, P., Singhal, S. S., and Awasthi, S. (1995) Physiological role of glutathione-S-transferases in protection mechanisms against lipid peroxidation: a commentary, *Biochem. Arch.*, **11**, 47-54.
95. Bao, Y., and Williamson, G. (1996) Metabolism of hydroperoxy-phospholipids in human hepatoma HepG2 cells, *J. Lipid Res.*, **37**, 2351-2360.
96. Lankin, V. Z., Bondar, T. N., and Tikhaze, A. K. (1997) The influence of free fatty acids on the lipoperoxidase activity of antioxidative enzymes-Se-containing glutathione peroxidase and nonselenic glutathione-S-transferase, *Dokl. Akad. Nauk*, **357**, 828-831.
97. Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F., and Montestrucque, S. (1983) The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides, *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 441-452, doi: 10.1016/0003-9861(83)90608-2.
98. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Osis, Y. G. (2002) Modeling the cascade of enzymatic reactions in liposomes including successive free radical peroxidation, reduction, and hydrolysis of phospholipid polyenoic acyls for studying the effect of these processes on the structural-dynamic parameters of the membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 566-574, doi: 10.1023/a:1015502429453.
99. Lankin, V. Z., Antonovsky, V. L., and Tikhaze, A. K. (2004) Regulation of free radical lipoperoxidation and organic peroxides metabolism during normal station and pathologic

- gies, in *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium*, Nova Sci. Publ., pp. 85-111.
100. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., et al. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/S0006297907100069.
  101. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 51-88, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
  102. Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., and Federici, L. (2018) Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases, *Oncogenesis*, **7**, 8, doi: 10.1038/s41389-017-0025-3.
  103. Goncalves, M., Moura Neto, J., Souza, C., Melo, P., and Reis, M. (2010) Evaluating glutathione S-Transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leukopenia, *Int. J. Lab. Hematol.*, **32**, e49-e56, doi: 10.1111/j.1751-553X.2009.01169.x.
  104. Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Coric, V., Djukic, T., et al. (2018) Glutathione transferases: potential targets to overcome chemoresistance in solid tumors, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3785, doi: 10.3390/ijms19123785.

## HYDROPEROXIDE-REDUCING ENZYME SYSTEMS IN REGULATION OF FREE-RADICAL PROCESSES

### Review

**M. G. Sharapov<sup>1\*</sup>, S. V. Gudkov<sup>2,3,4</sup>, and V. Z. Lankin<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center PSCBI RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: sharapov.mars@gmail.com*

<sup>2</sup> *Institute of General Physics named after A.M. Prokhorov, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 603022 Nizhny Novgorod, Russia*

<sup>4</sup> *All-Russian Research Institute of Phytopathology, 143050 Bolshiye Vyazemy, Russia*

<sup>5</sup> *FGBU "National Medical Research Center of Cardiology" of the Ministry of Health of Russia; 121552 Moscow, Russia*

The review presents the current understanding of the molecular mechanisms of oxidative stress development. The main stages of free radical reactions in the process of oxidative stress are considered. Endogenous and exogenous causes of the development of oxidative stress, including dysfunction of the cell oxidoreductase system, as well as the effect of various external physicochemical factors are discussed. The main participants in the antioxidant defense system, as well as the stages of its evolution, are described, with the main emphasis on several families of peroxidases: peroxiredoxins, glutathione peroxidases, and glutathione-S-transferases, which are quite similar in their phylogenetic, structural, and catalytic properties. Substrate specificity, similarities and differences in the mechanisms of catalysis of these enzymes are considered in detail. The role of peroxiredoxins, glutathione peroxidases and glutathione-S-transferases in the regulation of intracellular and intercellular signals mediated by hydroperoxides and interactions with other receptor / non-receptor proteins is discussed. The important role of these enzymes was shown not only in antioxidant protection, but also in the regulation of such cell processes as growth, differentiation and apoptosis.

**Keywords:** oxidative stress, reactive oxygen species, free radicals, peroxiredoxins, glutathione peroxidases, glutathione S-transferases

УДК 615;616-05

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ N-КОНЦЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ ГАЛАНИНА: КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

### Обзор

© 2021 О.И. Писаренко\*, И.М. Студнева, О.М. Веселова

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 121552 Москва, Россия; электронная почта: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 28.07.2021

После доработки 15.08.2021

Принята к публикации 16.08.2021

Дизайн новых препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний на основе эндогенных пептидных гормонов вызывает несомненный интерес и стимулирует интенсивные экспериментальные исследования. Одним из путей развития этой области является синтез коротких биоактивных пептидов, имитирующих эффекты более крупных пептидных молекул и обладающих улучшенными физико-химическими характеристиками. В последние годы обнаружено, что N-концевые фрагменты нейропептида галанина снижают метаболические и функциональные нарушения при экспериментальном повреждении сердца. В обзоре представлены данные литературы и обобщенные результаты собственных экспериментов о влиянии полноразмерного галанина и его химически модифицированных N-концевых фрагментов (2–11) и (2–15) на сердце в норме и при моделировании патофизиологических состояний *in vitro* и *in vivo*. Показано, что спектр действия пептидов на поврежденный миокард охватывает уменьшение гибели кардиомиоцитов от некроза, снижение повреждения сарколеммы, улучшение метаболического состояния миокарда, снижение образования активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов. Обсуждаются механизмы защитного действия модифицированных фрагментов галанина, связанные с активацией подтипа рецептора GalR2 и проявлением антиоксидантных свойств. Суммированные в обзоре данные указывают на перспективность молекулярного конструирования фармакологических агонистов рецептора GalR2, которые могут служить основой для разработки кардиопротекторов, оказывающих влияние на процессы свободно-радикального окисления и метаболической адаптации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** галанин, сердце, экспериментальная патология, активные формы кислорода, метаболизм, мембраны кардиомиоцитов, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты.

DOI: 10.31857/S0320972521100079

### ВВЕДЕНИЕ

Высокая распространённость сердечно-сосудистых заболеваний обуславливает необходимость разработки новых подходов к снижению

повреждений сердца при различных патофизиологических состояниях. В последнее время важную роль в механизмах регуляции физиологических функций отводят эндогенным биоактивным пептидам [1]. Открытый в 1983 году нейропептид галанин регулирует целый ряд жизненно важных процессов — память, сон, потребление пищи, алкогольная зависимость, невропатические боли, выработка других гормонов, метаболизм, ионный гомеостаз и осмос [2]. Галанин представляет собой низкомолекулярный пептид, состоящий из 29 аминокислотных остатков (а.о.) у большинства видов животных и 30 а.о. у человека. Он широко распространён в центральной и периферической нервной системе, а также в других тканях [3] и находится в тесной функциональной взаимосвязи с несколькими нейротрансмиттерами — ацетилхолином, серотонином, дофамином, кальцитонин-ген-связанным пептидом и вазоинтестинальным полипептидом [4]. В периферических органах, включая сердце, галанин действует не только через

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ДМПО — 5,5-диметил-пирролин-N-оксид; ЗР — зона риска; Докс — доксорубин; ИМ — инфаркт миокарда; И/Р — ишемия/реперфузия; КК-МВ — креатинкиназа-МВ; Кр — креатин; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ЛЖ — левый желудочек; ЛНП — липопротеиды низкой плотности; ПОЛ — перекисное окисление липидов; ПНА — передняя нисходящая коронарная артерия; ФКр — фосфокреатин; АС — аденилатциклаза; Cu,Zn-SOD — Cu,Zn-супероксиддисмутаза; G1 — N-концевой фрагмент галанина (2–11)-амид; G2 — N-концевой фрагмент галанина (2–15); G3 — модифицированный аналог галанина (2–15); G4 — модифицированный аналог галанина (2–15)-амид; G5 — модифицированный аналог галанина (2–15); G6 — модифицированный аналог галанина (2–11)-амид; G7 — галанин крысы (1–29); GSH-Px — глутатионпероксидаза; РТХ — коклюшный токсин; TBARS — продукты, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой.

\* Адресат для корреспонденции.

нейрональные механизмы, но и активируя семейство трансмембранных рецепторов GalR1–3 [3, 5]. Рецепторы галанина состоят из 349 а.о. и представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 54–60 кДа, сопряжённые с G-белками [6]. За связывание с рецепторами отвечает *N*-концевой фрагмент галанина, первые 15 аминокислотных остатков которого консервативны у большинства видов, *C*-терминальный фрагмент (17–29) варьирует у человека и животных и имеет слабую аффинность по отношению к рецепторам [2]. Широкий спектр биологической активности галанина, в том числе вызываемые им гормональные и нейромедиаторные сдвиги [7], предполагают участие галанинергической системы в активации защитных реакций организма.

### ВЛИЯНИЕ ГАЛАНИНА НА СЕРДЦЕ

Роль рецепторов галанина в регуляции сердечно-сосудистой системы мало изучена. Известно, что введение экзогенного галанина в ростральный вентролатеральный отдел ствола мозга способно оказывать гипотензивный эффект, снижая симпатический вазомоторный тонус, и вызывать тахикардию у крыс [8]. Изучение экспрессии галанина в симпатических нейронах сердца при ишемии миокарда показало, что количество мРНК галанина в сердце после перевязки передней нисходящей артерии (ПНА) значительно увеличивается [9]. Обнаружено, что концентрация галанина в левом желудочке (ЛЖ) ниже места перевязки ПНА значительно выше, чем в предсердиях и основании сердца, где повышение уровня галанина незначительно. Кардиальные симпатические нейроны после окончания ишемии/реперфузии (И/Р) в сердце находятся в активном состоянии достаточно долго, стимулируя экспрессию галанина, которая может иметь важные физиологические последствия [10]. Это, в частности, облегчает доставку галанина к нервным окончаниям, способствуя регенерации сенсорных нейронов, подвергшихся аксотомии, поэтому галанин может играть важную роль в восстановлении симпатических нервов. При гипоксии отмечено положительное инотропное действие галанина — улучшение сократимости папиллярной мышцы сердца морской свинки. Полагают, что оно обусловлено регуляцией внутриклеточного гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  и вызвано активацией АТФ-зависимых  $\text{K}^{+}$ -каналов [11].

Установлено, что повышенная экспрессия рецепторов галанина характерна для тканей с физиологически значимой утилизацией глюко-

зы и чувствительностью к инсулину — скелетные мышцы, сердце, жировая ткань и клетки панкреатических островков [12]. Более того, секреция галанина положительно коррелирует с уровнем глюкозы в крови, который, в свою очередь, тесно связан с чувствительностью к инсулину у здоровых волонтеров и пациентов с диабетом [13]. Введение антагониста галанина М35 здоровым и диабетическим крысам снижает чувствительность к инсулину, уменьшает концентрацию переносчика глюкозы GLUT4 и снижает экспрессию мРНК GLUT4 в мембране миоцитов и адипоцитов [14, 15]. Как известно, изоформа GLUT4 является важным представителем семейства белков-переносчиков глюкозы в сердце. Снижение содержания GLUT4 в сердце происходит одновременно с развитием сердечной недостаточности, ишемической кардиомиопатии у больных сахарным диабетом и при И/Р-повреждении [16, 17]. Напротив, увеличение экспрессии переносчика GLUT4 и его транслокация к сарколемме усиливает трансмембранный перенос глюкозы и может компенсировать нарушения энергетического обмена в клетках. Этот механизм предполагает участие галанина в механизмах адаптации сердца к нарушениям внутриклеточного обмена, связанным с недостаточным обеспечением энергией [18].

### ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ *N*-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ ГАЛАНИНА

Период полураспада галанина крысы (G7) в кровотоке, также, как и у большинства природных биоактивных пептидов, довольно короткий, и по данным Harling и Holst [19] составляет около 4 мин. Удаление *N*-концевого а.о. Gly1 у природных фрагментов G1 и G2 увеличивает время их полураспада в биологических средах до 10 мин [20]. Для изучения действия галанина при экспериментальной патологии сердца был синтезирован *N*-концевой фрагмент пептида (2–11)-амид (G1, таблица). Этот пептид является одним из немногочисленных лигандов, обладающих высокой специфичностью к рецептору GalR2, практически не связывается с рецептором GalR1 и проявляет слабую аффинность по отношению к GalR3 [21]. Экзогенный пептид G1 ингибировал апоптоз и снижал образование супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в митохондриях изолированных кардиомиоцитов крысы и кардиомиоцитах H9c2 при гипоксии/реоксигенации, а также улучшал метаболическое и функциональное восстановление сердца крысы после И/Р-повреждения

Характеристики синтезированных пептидов галанина

| Шифр | Последовательность                             | M <sub>расч.</sub> ,<br>г/моль | MALDI-TOF, m/z                                                      | Растворимость<br>в воде,<br>мг/мл | ВЭЖХ*                |            |
|------|------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|------------|
|      |                                                |                                |                                                                     |                                   | R <sub>t</sub> , мин | Чистота, % |
| G1   | WTLNSAGYLL-NH <sub>2</sub>                     | 1136,3                         | 1136,77                                                             | 0,25                              | 16,53                | 98,1       |
| G2   | WTLNSAGYLLGPHA-OH                              | 1499,7                         | 1498,64                                                             | ≈10                               | 15,34                | 97,1       |
| G3   | WTLNSAGYLLGP- <b>β</b> АН-OH                   | 1499,67                        | 1499,76, 1521,73[M + Na] <sup>+</sup> , 1537,72[M + K] <sup>+</sup> | >20                               | 14,66                | 98,2       |
| G4   | WTLNSAGYLLGPHA-NH <sub>2</sub>                 | 1498,68                        | 1499,72                                                             | ≈4                                | 14,85                | 96,2       |
| G5   | WTLNSAGYL-Nle-GPHR-OH                          | 1584,88                        | 1584,66                                                             | >20                               | 14,25                | 95,8       |
| G6   | WTLNAAGYLL-NH <sub>2</sub>                     | 1120,3                         | 1120,61, 1142,60[M + Na] <sup>+</sup> , 1158,58[M + K] <sup>+</sup> | ≈0,20                             | 17,70                | 96,7       |
| G7   | GWTLNSAGYLLGPHAIDN-HRSFSDKHGLT-NH <sub>2</sub> | 3164,45                        | 3163,47                                                             | >40                               | 15,80                | 98,1       |

Примечание. Модификации выделены жирным шрифтом.

\* Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Kromasil 100-5 C18 (4,0 × 250 мм), размер частиц сорбента 5 мкм; в качестве элюентов использовали: буфер А – 0,1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрил в буфере А; элюция со скоростью 1 мл/мин градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, детекция при λ = 220 нм.

*ex vivo* и *in vivo* [22]. Плохая растворимость в воде затрудняла исследование G1. Для преодоления этой проблемы был синтезирован N-концевой фрагмент галанина (2–15) (G2, таблица), обладающий высоким сродством к рецептору GalR2 и лучшей растворимостью в воде. Экзогенный пептид G2 улучшал восстановление функции изолированного сердца крысы после тотальной ишемии и ограничивал размеры инфаркта миокарда (ИМ) у крыс *in vivo* [23]. Эти эффекты сопровождался снижением образования активных форм кислорода (АФК) и улучшением энергетического состояния сердца.

Природные пептиды галанина G1 и G2 были использованы в качестве основы для получения оригинальных N-концевых фрагментов. Как правило, направленное химическое модифицирование агонистов рецепторов галанина GalR2 улучшает их физико-химические свойства [24]. С этой целью были применены приёмы структурной модификации, обеспечивающие повышенную устойчивость пептидов к действию протеолитических ферментов: амидирование C-концевой аминокислоты (пептид G4), введение в пептидную цепь остатков не природных аминокислот (β-аланина или норлейцина – пептиды G3 и G5 соответственно). Для повышения растворимости в водных средах в молекулу пептида G5 в качестве C-концевой аминокислоты был введён Arg. Наиболее растворимый в воде химерный лиганд G3 был получен присоединением природного дипептида карнозина к последовательности галанина (2–13). Карнозин является эффективным средством для предотвращения патологических состояний, связанных с оксидативным стрессом, болезнью Альцгеймера,

атеросклерозом и И/Р-повреждением сердца [25]. Модифицированные аналоги пептидов G1 и G2 были синтезированы с сохранением фармакофорных а.о., ответственных за связывание с рецептором GalR2 – Trp2, Asn6, Tyr9 и Gly12 [26]. Мы также учли, что удаление Gly1 уменьшает сродство N-концевых фрагментов к рецептору GalR1 [27]. В пептиде G6 Ser6 был замещён на Ala, поскольку в опытах с фрагментами галанина, мечеными <sup>125</sup>I, было показано, что такая замена увеличивает связывание лиганда с рецептором GalR2, уменьшая сродство к подтипам рецепторов GalR1 и GalR3 [5]. Полноразмерный галанин крысы (1–29) G7, который использовали в качестве положительного контроля, был получен конвергентным твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии [28]. Синтезированные пептиды были очищены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращённой фазе, их структура охарактеризована методами <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии [29].

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ГАЛАНИНА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА ПРИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ

Действие пептидов G1–7 было изучено на модели региональной ишемии миокарда и реперфузии у наркотизированных крыс *in vivo*. Защиту миокарда оценивали: 1) некротической гибелью кардиомиоцитов в зоне риска (ЗР) – размерами ИМ, нормализованными на величину ЗР (ИМ/ЗР, %), 2) повреждением клеточных

мембран — активностью маркёров некроза (креатинкиназы МВ (КК-МВ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови), 3) энергетическим состоянием ЗР — содержанием АТФ, АДФ и АМФ, фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр) и лактата, 4) образованием АФК — концентрацией спинового аддукта гидроксильных радикалов 5,5-диметил-пирролин-N-оксида-ОН (ДМПО-ОН) в интерстиции ЗР. Влияние пептидов на гемодинамическое состояние животных характеризовали изменениями систолического артериального давления (САД) и частоты сокращений сердца (ЧСС). Внутривенное введение пептидов G1–7 в диапазоне доз 0,25–3,0 мг/кг после 40-мин региональной ишемии одновременно с началом реперфузии, которая длилась 1 ч, снижало размеры ИМ и активность маркёров некроза в плазме [30, 31]. К окончанию реперфузии при использовании оптимальных доз G3 и G7 (1,0 и 0,5 мг/кг соответственно) ИМ снижался в среднем на 40%, а активность ЛДГ и КК-МВ — на 30% по сравнению с контролем (рис. 1).

Общий кардиопротекторный эффект каждого из пептидов был оценён путём ранжирования по пяти показателям [32]. Три из них характеризовали повреждение кардиомиоцитов и мембран (размеры ИМ, активность МВ-КК и ЛДГ в плазме) и два — реакцию сердца и всего организма на введение лиганда (изменения САД и ЧСС). Эффективность пептидов при такой суммарной оценке их действия снижалась в следующем ряду: G3 > G1 > G7 > G6 > G4 > G2 > G5. Таким образом, модифицированный N-концевой фрагмент галанина G3 обнаруживал наибольшую способность к снижению И/Р-повреждения сердца.

Уменьшение некроза кардиомиоцитов под действием G2, G3 и G7 сопровождалось улуч-

шением метаболического состояния ЗР в конце реперфузии — увеличением содержания АТФ, общего фонда адениннуклеотидов ( $\Sigma\text{АН} = \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$ ) и ФКр [33, 34]. Под действием пептида G3 отмечено увеличение содержания общего креатина ( $\Sigma\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$ ) и отношения ФКр/Кр в ЗР, что может отражать меньшие повреждения сарколеммы [35] и лучшее функциональное сопряжение изоформ креатинкиназы в фосфокреатиновом челноке [36]. Введение пептидов G2, G3 и G7 крысам после региональной ишемии существенно снижало образование аддукта гидроксильных радикалов ДМПО-ОН в интерстиции зоны риска ЛЖ при возобновлении кровотока [31]. Это свидетельствовало об уменьшении генерирования АФК в ткани реперфузированного миокарда под действием пептидов. Дополнительно после окончания реперфузии в ЗР миокарда животных, защищённых введением G3 или G7, было обнаружено более низкое содержание тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов (TBARS) — продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которое не отличалось от предшлемических значений [31, 33]. Эти данные однозначно указывают на способность пептидов галанина уменьшать окислительный стресс при реперфузии.

### ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА G3 ПРИ ДОКСОРУБИЦИН-ИНДУЦИРУЕМОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

Наиболее эффективный модифицированный N-концевой фрагмент галанина G3 был изучен при кардиомиопатии у крыс, которая развивалась в течение 8 недель после введения

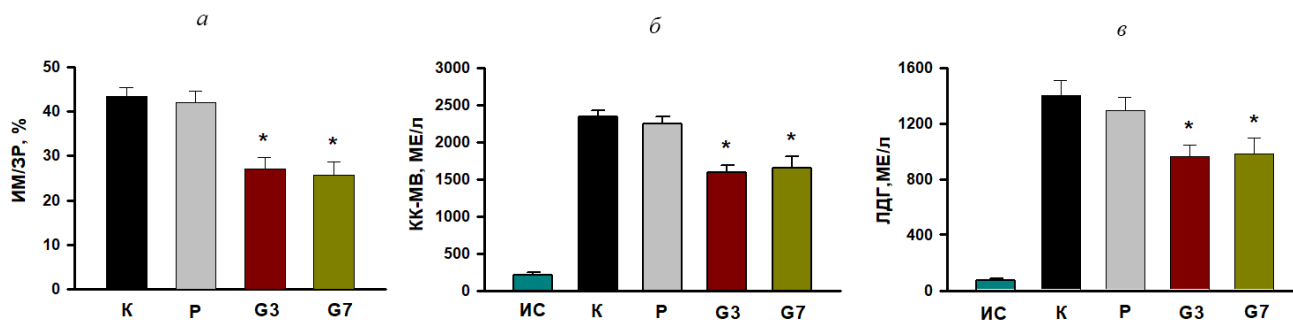


**Рис. 1.** Влияние внутривенного введения пептидов галанина на показатели И/Р повреждения сердца у крыс *in vivo*. а — Действие пептидов G3 и G7 на размеры инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %). К — контроль (введение физиологического раствора), ИМ — инфаркт миокарда, ЗР — зона риска, Р — растворитель, 0,2%-ный диметилсульфоксид (ДМСО). Данные представлены как  $M \pm m$  для групп из 8 животных. Влияние пептидов на активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ, (б)) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, (в)) в плазме крови крыс в конце реперфузии. ИС — исходное состояние (до окклюзии ПНА), К — контроль (введение физиологического раствора), Р — растворитель, 0,2%-ный ДМСО, G3 (1 мг/кг), G7 (0,5 мг/кг). Данные представлены как  $M \pm m$  для групп из 8 животных. \* Достоверно отличается ( $p < 0,01$ ) от К и Р

доксорибуцина (Докс). Снижение повреждения функции сердца, уменьшение ремоделирования левого желудочка сердца и морфологических изменений в миокарде в конце опытов при совместном введении Докс и пептида G3 сопровождались значительным улучшением метаболизма миокарда. На это указывало более высокое содержание АТФ,  $\Sigma$ АН, ФКр и  $\Sigma$ Кр в сердце, которое сочеталось со снижением накопления глюкозы и лактата [37]. Эти эффекты были связаны с увеличением окислительного фосфорилирования под действием G3. Так, дыхательный контроль митохондрий на 5 мМ глутамате и 5 мМ малате в группе G3 + Докс был достоверно выше, чем в группе Докс и достоверно не отличался от значения в контроле [38]. Улучшение аэробного обмена под действием пептида G3 в сердце, повреждённом Докс, восстанавливало нормальное содержание Ala, Glu и Asp и снижало образование цитотоксичного аммиака. Такие сдвиги во внутриклеточном обмене миокарда отражают снижение отношения NADH/NAD<sup>+</sup> в цитозоле, нормализацию функции малат-аспартатного челнока и цикла трикарбоновых кислот [39].

Окислительный стресс является одним из ведущих факторов кардиотоксичности, инициируемой Докс [40]. В нашей работе это подтверждалось высокими уровнями продуктов ПОЛ TBARS на системном и на органном уровне, а также повышенной активностью специфичного маркера некроза сердца — КК-МВ в плазме у животных, получавших Докс [37, 38]. Введение пептида G3 при повреждении сердца Докс снижало содержание продуктов ПОЛ в сердце и плазме животных и одновременно улучшало интегрированность мембран кардиомиоцитов, снижая активность КК-МВ в плазме (рис. 2). Эти эффекты сопровождались увеличением активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) в мио-

карде, указывая на усиление антиоксидантной защиты сердца [41]. Повышение активности Cu,Zn-SOD и GSH-Px могло быть связано с увеличением экспрессии генов этих ферментов под влиянием G3. На такую возможность указывают результаты недавней работы Timotin et al. [42], в которой уменьшение размера инфаркта миокарда у мышей, получавших пептид G7, сочеталось с увеличением мРНК Cu,Zn-SOD в кардиомиоцитах. Введение одного пептида G3 здоровым животным в течение 8 недель не вызывало изменений активности КК-МВ и антиоксидантных ферментов. Результаты указывают на возможность использования модифицированных фрагментов галанина для коррекции метаболического и антиоксидантного состояния сердца при химиотерапии антрациклинами.

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ГАЛАНИНА НА ОКИСЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Мы изучили действие пептидов галанина на параметры свободнорадикального окисления природных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в плазме крови здоровых доноров. Для этого на модели Cu<sup>2+</sup>-инициированного окисления изолированных ЛНП использовали природный фрагмент галанина (2–15) G2, его модифицированный аналог G3 и полноразмерный галанин G7. Длительность инкубации пептидов с ЛНП составляла 3 ч. Продолжительность периода индукции окисления ЛНП характеризовали лаг-фазой ( $\tau$ ), которую определяли из кинетических кривых [43]. На этой модели окисления ЛНП синтетический фенольный антиоксидант, бутилированный гидрокситолуол (ВНТ) в концентрации 0,01 мМ, обладал наиболее выраженным ингибирующим действием [31]. Из приведённых на рис. 3 значений  $\tau$  следует, что

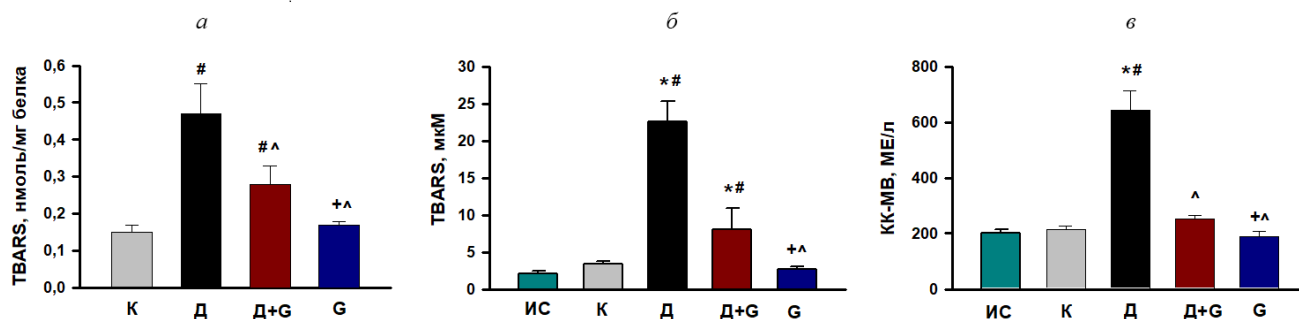


**Рис. 2.** Показатели окислительного стресса и повреждения мембран кардиомиоцитов в исследуемых группах. *а* — Содержание продуктов ПОЛ (TBARS) в сердце. *б* — Концентрация TBARS в плазме крови. *в* — Активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. ИС — исходное состояние, К — контроль, Д — Докс, Д + G — Докс + пептид G3, G — пептид G3. Данные представлены как М + m (n = 12).  $p < 0,05$  от: \* ИС, # К, ^ Д, + Д + G

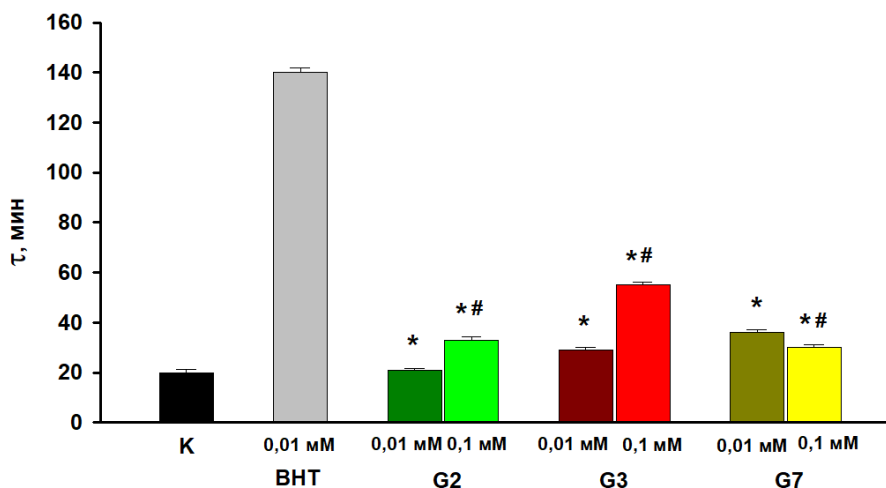


**Рис. 3.** Продолжительность периодов индукции ( $\tau$ ) свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии различных концентраций пептидов галанина. К — контроль; ВНТ — 0,01 мМ бутилированный гидрокситолуол; \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с 0,01 мМ пептидом;  $n = 5$

исследованные пептиды галанина также ингибировали окисление липидов. При концентрации 0,01 мМ продолжительность периодов индукции окисления для G2, G3 и G7 была достоверно выше этого показателя в контроле. Увеличение концентрации пептидов в среде инкубации до 0,1 мМ приводило к возрастанию антиоксидантной активности G2 и G3 и незначительному снижению ингибирующего действия G7. Из этих результатов следует, что способность ингибировать свободнорадикальное окисление ЛНП у этих соединений снижалась в следующем ряду: G2 > G7 > G3.

#### ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СУБСТАНЦИИ ПЕПТИДА G3

Оценку параметров токсичности G3 проводили по методу Deichman и Le Blanc [44] для определения средней смертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>). Однократные внутривенные введения субстанции пептида G3 мышам линии BALB/c в диапазоне доз 37–520 мг/кг не вызывали каких-либо признаков интоксикации и гибели животных в течение 14 дней наблюдения [45]. Высшая из испытанных доз вещества (520 мг/кг) оказалась максимально возможной из-за ограничения по растворимости. Она в 520 раз превышала разовую терапевтическую дозу вещества, рекомендованную для человека (1 мг/кг). Отсутствие признаков интоксикации веществом и гибели животных при однократном введении пептида в максимально возможной дозе из-за ограничений по растворимости не позволили установить величину ЛД<sub>50</sub>. В то же время полученные ре-

зультаты свидетельствуют о хорошей переносимости пептида G3 при введении мышам.

#### ПУТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ, АКТИВИРУЮЩИЕСЯ РЕЦЕПТОРАМИ ГАЛАНИНА

Биологические эффекты галанина могут реализовываться через сопряжённые с G-белками трансмембранные рецепторы (7-TM GPCR) GalR1, GalR2 и GalR3 [3, 5]. Эти рецепторы демонстрируют различия в распределении в зависимости от типа ткани. GalR1 и GalR2 преимущественно находятся в головном мозге, мышцах, жировой ткани и желудке [46], тогда как GalR3, но не GalR1, экспрессируется в лёгких и почках [47]. Все три подтипа рецепторов присутствуют в сердце [2, 5], но распределение мРНК GalR1–3 практически не изучено и не картировано по отделам сердца [48]. Поэтому изучение экспрессии и распределения этих рецепторов в миокарде методами иммуногистохимии, гибридизации *in situ* и связывания флуоресцентных лигандов необходимо для развития подходов к защите сердца с помощью модифицированных фрагментов галанина.

Активация GalR включает различные пути передачи сигналов в зависимости от подтипов рецепторов (рис. 4). Большинство фармакологических исследований показывает, что сигнализация через GalR1 приводит к ингибированию активности аденилатциклазы (АЦ) и снижает уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в цитозоле, вызывает открытие  $K^+$ -канала внутреннего выпрямления (IRK) и



тов при экспериментальной патологии сердца. Они заключались в уменьшении некротической гибели кардиомиоцитов, снижении повреждения клеточных мембран, уменьшении дисфункции митохондрий, улучшении метаболического и антиоксидантного состояния миокарда, снижении образования АФК и продуктов ПОЛ. Существенно, что действие полноразмерного галанина G7, связывающегося со всеми подтипами рецепторов GalR1–3, воспроизводилось фрагментами пептида, обладающими наибольшей аффинностью к рецептору GalR2. Это относится как к природным фрагментам G1 и G2, так и к их модифицированным аналогам G3–6. Среди исследованных пептидов высокую активность на всех использованных моделях обнаруживал синтетический химерный агонист G3. Эти данные указывают на принципиальную роль рецепторов GalR2 в кардиопротекторном действии изученных агонистов. Механизмы действия биологически активных фрагментов галанина при экспериментальной патологии сердца условно можно разделить на рецептор-зависимые и антиоксидантные.

Активация пептидами галанина различных путей трансдукции при связывании с рецептором GalR2 может способствовать меньшему повреждению кардиомиоцитов (рис. 4). Ингибирование активности аденилатциклазы при сопряжении с белком Gi/o приводит к ингибированию транскрипционного фактора CREB. Это повышает экспрессию транспортера глюкозы GLUT4 и его перемещение в сарколемму, стимулируя захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами [53]. Запуск этого механизма имеет решающее значение для обеспечения функции сердца в условиях снижения продукции АТФ [17]. Сопряжение рецептора GalR2 с белком Gq/11 посредством активации PLC регулирует  $Ca^{2+}$ -гомеостаз, что улучшает инотропные свойства сердца. Сигналинг GalR2 через белок Gq/11 вызывает фосфорилирование протеинкиназы B (Akt), ингибирование проапоптозных белков BAD/BAX и снижение активности каспазы-3 и каспазы-9 [2, 54]. Активация GalR2 стимулирует сигнальные пути, активируемые митоген-активируемыми протеинкиназами (MEK1/2 и ERK1/2), приводящие к блокированию открытия митохондриальных пор временной проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствует выживанию и подвижности клеток [55]. Кроме того, фосфорилирование ERK способствует повышенной экспрессии рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR), контролирующими энергетический метаболизм, включая и экспрессию PPAR $\gamma$ , стимулирующего поглощение и

окисление глюкозы кардиомиоцитами [56]. Из этого следует, что пептидные агонисты рецептора GalR2 способны усиливать механизмы метаболической защиты при повреждении сердца.

Антиоксидантные эффекты пептидов галанина, связанные со снижением продукции АФК и уменьшением образования продуктов ПОЛ, наблюдались при окислительном стрессе *in vivo* (И/Р-повреждении сердца и Докс-индуцируемой кардиомиопатии у крыс) и свободнорадикальном окислении ЛНП плазмы крови человека *in vitro*. Как известно, гиперпродукция АФК и ПОЛ вызывают нарушение структуры и функций клеточных мембран, изменение ионного гомеостаза и гибель клеток от некроза и апоптоза [57]. Полученные нами результаты показывают, что в защите пептидами галанина от повреждающего действия АФК могут участвовать ферменты системы антиоксидантной защиты сердца — SOD, каталаза (CAT) и GSH-Px, активность которых на использованных экспериментальных моделях увеличивалась [31, 33, 41]. Это указывает на возможность усиления экспрессии генов, кодирующих эти ферменты [42]. С другой стороны, при повреждении миокарда, сопровождающемся нарушениями структуры мембран кардиомиоцитов, возможен перенос экзогенных пептидов галанина из кровотока во внутриклеточное пространство. Последнее не исключает непосредственного взаимодействия пептидов с антиоксидантными ферментами сердца. Такая ситуация была смоделирована нами инкубацией пептидов G2, G3 и G7 с коммерческими ферментами Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT в модельных системах *in vitro* [31]. Однако несмотря на длительную инкубацию (в течение 24 ч), пептиды галанина не оказывали существенного однонаправленного влияния на активность этих ферментов. Наконец, нельзя исключить прямого антиоксидантного действия исследованных пептидов — их способность перехватывать АФК и ингибировать ПОЛ [1, 58]. Такие свойства G2, G3 и G7 могли проявляться при подавлении свободнорадикального окисления липидов плазмы крови человека и снижении образования спинового аддукта гидроксильных радикалов ДМПО-ОН при реперфузии ЗР сердца после региональной ишемии [31, 34]. Дальнейшее изучение механизмов снижения окислительного стресса с помощью фармакологических лигандов рецептора GalR2 представляется важной задачей будущих исследований. Одним из подходов к её решению может быть изучение кинетики взаимодействия пептидов галанина с АФК с помощью спектроскопии ЭПР — прямого метода регистрации свободных радикалов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы создание лекарственных средств на основе биоактивных пептидов ускорило благодаря исследованиям генома, расширившим выбор клеточных мишеней, и успехам комбинационной химии и твердофазного синтеза пептидов с помощью Fmoc-методологии. Использование природных пептидных биорегуляторов привлекает внимание высокой эффективностью, возможностью использования в малых дозах, отсутствием побочных и токсикологических реакций. В частности, большое внимание уделяется «галанинергической терапии» с помощью галанина и лигандов его рецепторов. В этом направлении основные усилия сфокусированы на изучении синтетических агонистов/антагонистов рецепторов GalR1–3 различной химической природы на клеточных линиях для создания препаратов, корректирующих нарушения метаболизма при ожирении, диабете и нейродегенеративных заболеваниях мозга [2, 3, 7]. Приведённые выше данные показывают, что галанинергическая система является перспективной мишенью для фармакологического воздействия при функциональных и метаболических нарушениях сердца. Они указывают на целесообразность молекулярного конструирования

пептидных агонистов рецептора галанина GalR2 с улучшенными физико-химическими характеристиками (растворимость, протеолитическая стабильность, устойчивость к окислению при хранении) и необходимость изучения молекулярных механизмов их действия. Подобные соединения могут служить основой для разработки нового класса кардиопротекторов, способствуя уменьшению стресс-индуцированных изменений в организме за счёт влияния на процессы свободнорадикального окисления и метаболической адаптации.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-015-0008-а и 18-015-0009-а).

**Благодарности.** Авторы признательны М.В. Сидоровой, А.А. Тимошину и В.З. Ланкину за ценные советы при обсуждении этого обзора.

**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

- Jakubczyk, A., Karas, M., Rybczynska-Tkaczyk, K., Zielińska, E., and Zieliński, D. (2020) Current trends of bioactive peptides – new sources and therapeutic effect, *Foods*, **9**, 846, doi: 10.3390/foods9070846.
- Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., Hökfelt, T., and Kofler, B., (2015) Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity, *Pharmacol. Rev.*, **67**, 118–175, doi: 10.1124/pr.112.006536.
- Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., and Walker, M. W. (2000) Galanin receptor subtypes, *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 109–117, doi: 10.1016/S0165-6147(00)01446.
- Melander, T., Hökfelt, T., Rokaeus, Å., Oertel, W. H., Verhofstad, A., and Goldstein, M. (1986) Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS, *J. Neurosci.*, **6**, 3640–3654, doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-12-03640.1986.
- Webling, K. E. B., Runesson, J., Bartfai, T., and Langel, Ü. (2012) Galanin receptors and ligands, *Front. Endocrinol.*, **3**, 146, doi: 10.3389/fendo.2012.00146.
- Wada, N. (2016) Galanin Peptide Family, in *Handbook of Hormones. Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*, Academic Press, pp. 203–204, e24–2, doi: 10.1016/B978-0-12-801028-0.00024-6.
- Mitsukawa, K., Lu, X., and Bartfai, T. (2008) Galanin, galanin receptors and drug targets, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1796–1805, doi: 10.1007/s00018-008-8153-8.
- Abbott, S., and Pilowsky, P. (2009) Galanin microinjection into rostral ventrolateral medulla of the rat is hypotensive and attenuates sympathetic chemoreflex, *Am. J. Physiol.*, *Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **296**, R1019–R1026, doi: 10.1152/ajpregu.90885.2008.
- Ewert, T. J., Gritman, K. R., Bader, M., and Habecker, B. A. (2008) Post-infarct cardiac sympathetic hyperactivity regulates galanin expression, *Neurosci. Lett.*, **436**, 163–166.
- Habecker, B. A., Gritman, K. R., Willison, B. D., and Van Winkle, D. M. (2005) Myocardial infarction stimulates galanin expression in cardiac sympathetic neurons, *Neuropeptides*, **39**, 89–95, doi: 10.1016/j.npep.2004.11.003.
- Kocic, I. (1998) The influence of the neuropeptide galanin on the contractility and the effective refractory period of guinea-pig heart papillary muscle under normoxic and hypoxic conditions, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 1361–1364, doi: 10.1111/j.2042-7158.1998.tb03360.x.
- Fang, P., Sun, J., Wang, X., Zhang, Z., Bo, P., and Shi, M. (2013) Galanin participates in the functional regulation of the diabetic heart, *Life Sci.*, **92**, 628–632, doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.024.
- Legalkis, I. N., Mantzouridis, T., and Mountokalakis, T. (2007) Positive correlation of galanin with glucose in healthy volunteers during an oral glucose tolerance test, *Horm. Metab. Res.*, **39**, 53–55, doi: 10.1055/s-2006-957346.
- Leto, D., and Saltiel, A. R. (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 383–396, doi: 10.1038/nrm3351.
- Guo, L., Shi, M., Zhang, L., Li, G., Zhang, L., et al. (2011) Galanin antagonist increases insulin resistance by reducing glucose transporter 4 effect in adipocytes of rats, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **173**, 159–163, doi: 10.1016/j.ygcen.2011.05.011.

16. Adachi, H., Ohno, T., Oguri, M., Oshima, S., and Taniguchi, K. (2007) Effect of insulin sensitivity on severity of heart failure, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **77** (Suppl. 1), S258-S262, doi: 10.1016/j.diabres.2007.01.068.
17. Doehner, W., Gathercole, D., Ciccoira, M., Krack, A., Coats, A. J. S., et al. (2010) Reduced glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle predicts insulin resistance in non-diabetic chronic heart failure patients independently of body composition, *Int. J. Cardiol.*, **138**, 19-24, doi: 10.1016/j.ijcard.2008.07.004.
18. Tian, R., and Abel, E. D. (2001) Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis, *Circulation*, **103**, 2961-2966, doi: 10.1161/01.CIR.103.24.2961.
19. Harling, H., and Holst, J. J. (1992) Circulating galanin: origin, metabolism, and pharmacokinetics in anesthetized pigs, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **262**, E52-E57, doi: 10.1152/ajpendo.1992.262.1.
20. Holst, J. J., Bersani, M., Hvidberg, A., Knigge, U., Christiansen, E., et al. (1993) On the effects of human galanin in man, *Diabetologia*, **36**, 653-657, doi: 10.1007/BF00404076.
21. Webling, K., Runesson, J., Lang, A., Saar, I., Kofler, B., and Langel, U. (2016) Ala5-galanin (2-11) is a GAL2R specific galanin analogue, *Neuropeptides*, **60**, 75-82, doi: 10.1016/j.npep.2016.08.008.
22. Timotin, A., Pisarenko, O., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by exogenous galanin fragment, *Oncotarget*, **8**, 21241-21252, doi: 10.18632/oncotarget.15071.
23. Pisarenko, O., Timotin, A., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Cardioprotective properties of N-terminal galanin fragment (2-15) in experimental ischemia/reperfusion injury, *Oncotarget*, **8**, 60, 101659-101671, doi: 10.18632/oncotarget.21503.
24. Saar, I., Lahe, J., Langel, K., Runesson, J., Webling, K., et al. (2013) Novel systemically active galanin receptor 2 ligands in depression-like behavior, *J. Neurochem.*, **127**, 114-123, doi: 10.1111/jnc.12274.
25. Aldini, G., Facino, R. M., Beretta, G., and Carini, M. (2005) Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives, *Biofactors*, **24**, 77-87, doi: 10.1002/biof.5520240109.
26. Wang, S., He, C., Hashemi, T., and Bayne, M. (1997) Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes, *J. Biol. Chem.*, **272**, 31949-31952, doi: 10.1074/jbc.272.51.31949.
27. Liu, H. X., Brumovsky, P., Schmidt, R., Brown, W., Payza, K., et al. (2001) Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: selective actions via GalR1 and GalR2 receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9960-9964, doi: 10.1073/pnas.161293598.
28. Сидорова М. В., Палькеева М. Е., Авдеев Д. В., Молокочев А. С., Овчинников М. В., и др. (2020) Конвергентный синтез галанина крысы и изучение его биологической активности, *Биоорг. химия*, **46**, 36-46, doi: 10.31857/S0132342320010121.
29. Palkeeva, M., Studneva, I., Molokoedov, A., Serebryakova, L., Veselova, O., et al. (2019) Galanin/GalR1-3 system: a promising therapeutic target for myocardial ischemia/reperfusion injury, *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 1556-1562, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.182.
30. Serebryakova, L., Pal'keeva, M., Studneva, I., Molokoedov, A., Veselova, O., et al. (2019) Galanin and its N-terminal fragments reduce acute myocardial infarction in rats, *Peptides*, **111**, 127-131, doi: 10.1016/j.peptides.2018.05.001.
31. Pisarenko, O. I., Studneva, I. M., Serebryakova, L. I., Timoshin, A. A., Konovalova, G. G., et al. (2021) Antioxidant properties of galanin and its N-terminal fragments in *in vitro* and *in vivo* oxidative stress modeling, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 496-505, doi: 10.1134/S0006297921040106.
32. Glanz, S. A. (2021) *Primer of Biostatistics*, 7th Edn, The McGraw-Hill Companies Inc, New York.
33. Studneva, I., Serebryakova, L., Veselova, O., Pal'keeva, M., Molokoedov, A., et al. (2019) Galanin receptors activation modulates myocardial metabolic and antioxidant responses to ischaemia/reperfusion stress, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **46**, 1174-1182, doi: 10.1111/1440-1681.13164.
34. Serebryakova, L., Studneva, I., Timoshin, A., Veselova, O., Pal'keeva, M., et al. (2021) Galanin peptides alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing reactive oxygen species form, *Inter. J. Peptide Res. Ther.*, **27**, 2039-2048, doi: 10.1007/s10989-021-10231-x.
35. Zervou, S., Whittington, H. J., Russell, A. J., and Lygate, C. A. (2016) Augmentation of creatine in the heart, *Med. Chem.*, **16**, 19-28.
36. Guimarães-Ferreira, L. (2014) Role of the phosphocreatine system in energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles, *Einstein (Sao Paulo)*, **12**, 126-131.
37. Studneva, I., Palkeeva, M., Veselova, O., Molokoedov, A., Ovchinnikov, M., et al. (2019) Protective effects of a novel agonist of galanin receptors against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Cardiovasc. Toxicol.*, **19**, 136-146, doi: 10.1007/s12012-018-9483-x.
38. Студнева И. М., Палькеева М. Е., Веселова О. М., Молокочев А. С., Любимов Р. О., и др. (2019) Защитное действие модифицированного фрагмента галанина при сердечной недостаточности у крыс, вызванной доксорубицином, *Биомед. хим.*, **65**, 51-56, doi: 10.18097/PBMC20196501051.
39. LaNoue, K. F., Walajtys, E. I., and Williamson, J. R. (1973) Regulation of glutamate metabolism and interactions with citric acid cycle in rat heart mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **248**, 7171-7183.
40. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004) Anthracyclines: and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 185-229, doi: 10.1124/pr.56.2.6.
41. Студнева И. М., Веселова О. М., Бахтин А. А., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З., Писаренко О. И. (2020) Механизмы защиты сердца синтетическим агонистом рецепторов галанина при повреждении хроническим введением доксорубицина, *Acta Naturae*, **12**, 28-37, doi: 10.32607/actanaturae.10945.
42. Timotin, A., Cinato, M., Kramar, S., Loy, H., Merabishvil, G., et al. (2019) Galanin is a checkpoint regulator of mitochondrial biogenesis coordinating a pro-survival phenotype in post-infarct myocardial remodeling, preprint, doi: 10.2139/ssrn.3424189.
43. Lankin, V., Konovalova, G., Tikhaze, A., Shumaev, K., Kumskova, E., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
44. Deichman, W. B., and Le Blanc, T. J. (1943) Immediately dangerous to life or health (IDLH) values, *J. Indust. Hyg. Toxicol.*, **25**, 415-417.
45. Серебрякова Л. И., Палькеева М. Е., Студнева И. М., Овчинников М. В., Веселова О. М., и др. (2019) Кар-

- диометаболическая эффективность и токсикологическая характеристика фармакологического агониста рецепторов галанина, *Биомед. химия.*, **65**, 231-238, doi: 10.18097/PBMC20196503231.
46. Li, R. Y., Song, H. D., Shi, W. J., Hu, S. M. S., Yang, Y. S., et al. (2004) Galanin inhibits leptin expression and secretion in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes, *J. Mol. Endocrinol.*, **33**, 11-19, doi: 10.1677/jme.0.0330011.
  47. Waters, S. M., and Krause, J. E. (2000) Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues, *Neuroscience*, **95**, 265-271.
  48. Šipkova, J., Kramarikova, I., Hynie, S., and Klenerova, V. (2017) The Galanin and galanin receptor subtypes, its regulatory role in the biological and pathological functions, *Physiol. Res.*, **66**, 729-740, doi: 10.33549/physiolres.933576.
  49. Wang, S., Hashemi, T., Fried, S., Clemmons, A. L., and Hawes, B. E. (1998) Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes, *Biochemistry*, **37**, 6711-6717.
  50. Anselmi, L., Stella, S. L., Brecha, N. C., and Sternini, C. (2009) Galanin inhibition of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  influx in rat cultured myenteric neurons is mediated by galanin receptor 1, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1107-1114.
  51. Wittau, N., Grosse, R., Kalkbrenner, F., Gohla, A., Schultz, G., and Gudermann, T. (2000) The galanin receptor type 2 initiates multiple signaling pathways in small cell lung cancer cells by coupling to G(q), G(i) and G(12) proteins, *Oncogene*, **19**, 4199-4209.
  52. Kolakowski, L. F., O'Neill, G. P., Howard, A. D., Broussard, S. R., Sullivan, K. A., et al. (1998) Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3, *J. Neurochem.*, **71**, 2239-2251, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062239.x.
  53. Fang, P., Shib, M., Guo, L., He, B., Wang, Q., et al. (2014) Effect of endogenous galanin on glucose transporter 4 expression in cardiac muscle of type 2 diabetic rats, *Peptides*, **62**, 159-163, doi: 10.1016/j.peptides.2014.10.001.
  54. Krijnen, P. A., Nijmeijer, R., Meijer, C. J., Visser, C. A., Hack, C. E., and Niessen, H. W. (2002) Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction, *J. Clin. Pathol.*, **55**, 801-811, doi: 10.1136/jcp.55.11.801.
  55. Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J. Clin. Invest.*, **123**, 92-100, doi: 10.1172/JCI62874.
  56. Jay, M. A., and Ren, J. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, *Curr. Diab. Rev.*, **3**, 33-39, doi: 10.2174/157339907779802067.
  57. Münzel, T., Camici, G. G., Maack, C., Bonetti, N. R., Fuster, V., and Kovacic, J. C. (2017) Oxidative stress on the heart and vasculature: Part 2 of a 3-Part series, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **70**, 212-229, doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.035.
  58. Power, O., Jakeman, P., and FitzGerald, R. J. (2013) Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides, *Amino Acids*, **44**, 797-820, doi: 10.1007/s00726-012-1393-9.

## MODIFIED N-TERMINAL FRAGMENTS OF GALANIN: CARDIOPROTECTIVE PROPERTIES AND MECHANISMS OF ACTION

### Review

O. I. Pisarenko\*, I. M. Studneva, and O. M. Veselova

*National Medical Research Center for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; E-mail: olpi@live.ru*

The design of new drugs for the treatment of cardiovascular diseases based on endogenous peptide hormones is of undoubted interest and stimulates intensive experimental research. One of the ways for the development of this area is the synthesis of short bioactive peptides that mimic the effects of larger peptide molecules and have improved physicochemical characteristics. In recent years, it has been found that the N-terminal fragments of the neuropeptide galanin reduce metabolic and functional disorders in experimental heart damage. The review presents literature data and generalized results of our own experiments on the effect of full-length galanin and its chemically modified N-terminal fragments (2-11) and (2-15) on the heart in normal conditions and in modeling pathophysiological conditions *in vitro* and *in vivo*. It was shown that the spectrum of action of peptides on the damaged myocardium encompasses a decrease in the death of cardiomyocytes from necrosis, a decrease in sarcolemma damage, an improvement in the metabolic state of the myocardium, a decrease in the formation of reactive oxygen species and lipid peroxidation products. The mechanisms of the protective action of modified galanin fragments associated with the activation of the GalR2 receptor subtype and the manifestation of antioxidant properties are discussed. The data summarized in the review indicate that the molecular design of pharmacological agonists of the GalR2 receptor is promising, which can serve as a basis for the development of cardioprotectors that affect the processes of free radical oxidation and metabolic adaptation.

**Keywords:** galanin, heart, experimental pathology, reactive oxygen species, metabolism, cardiomyocyte membranes, lipid peroxidation, antioxidant enzymes

УДК 577.25

## РАННЯЯ ИНДУКЦИЯ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОТРОФИНОВ И микроРНК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕРВНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2021 А.А. Шмакова<sup>1,2</sup>, К.Д. Рысенкова<sup>1,2</sup>, О.И. Ивашкина<sup>3,4,5</sup>, А.М. Груздева<sup>3</sup>,  
П.С. Климович<sup>1,2</sup>, В.С. Попов<sup>1</sup>, К.А. Рубина<sup>1</sup>, К.В. Анохин<sup>3,4</sup>,  
В.А. Ткачук<sup>1,2</sup>, Е.В. Семина<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192 Москва, Россия; электронная почта: e-semina@yandex.ru

<sup>2</sup> Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ Кардиологии  
Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 121552 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт перспективных исследований мозга, 119192 Москва, Россия; электронная почта: k.anokhin@gmail.com

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, 125315 Москва, Россия

<sup>5</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.11.2020

После доработки 21.06.2021

Принята к публикации 30.06.2021

Рецепторы нейротрофинов, взаимодействуя со своими лигандами, регулируют в головном мозге выживаемость нервных клеток, формирование нейронных связей и синаптическую пластичность. В данном исследовании был проведён анализ ранних изменений экспрессии генов рецепторов нейротрофинов *Ntrk1* (TrkA), *Ntrk2* (TrkB), *Ntrk3* (TrkC), *Ngfr* (p75NTR) и контролирующих их микроРНК в структурах головного мозга мыши после индукции судорожной нервной активности введением пентилентетразола. Полученные результаты показывают, что экспрессия *Ntrk3* и *Ngfr* возрастает в коре и гиппокампе через 1–3 ч после судорог, экспрессия *Ntrk2* возрастает в передней коре через 3–6 ч, а в гиппокампе наблюдается индукция экспрессии через 1 и 6 ч. При этом в передней и задней коре, но не в гиппокампе, повышается соотношение сигнальных белков Bcl-2/Bax, отражающее активацию анти-апоптотической сигнализации. Одновременно с этим в гиппокампе через 3 ч после введения пентилентетразола возрастает экспрессия микроРНК-9 и микроРНК-29а, предсказанной мишенью которых является мРНК *Ntrk3*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в состав раннего клеточного ответа на судорожную нервную активность в головном мозге входит активация экспрессии генов рецепторов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr*, микроРНК-9 и микроРНК-29а, а также сигнальный путь с участием белков Bcl-2 и Bax, что может характеризовать их как важных посредников в регуляции адаптации и выживаемости нейронов в условиях генерализованной нервной активности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рецепторы нейротрофинов TrkA, TrkB, TrkC, и p75NTR, микроРНК, микроРНК-9 и микроРНК-29а, гены раннего ответа, активация нейронов, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972521100080

### ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофины и их рецепторы являются важными регуляторами пролиферации, дифференцировки и выживания нейрональных клеток

Принятые сокращения: BDNF – brain-derived neurotrophic factor, мозговой нейротрофический фактор; GO:BP – Gene ontology: biological processes, генная онтология; биологические процессы; NGF – фактор роста нервов; p75NTR – нейротрофиновый рецептор p75; PTZ – пентилентетразол; tPA – тканевой активатор плазминогена; Trk – тропомиозин-рецепторные киназы; uPAR – урокиназный рецептор.

\* Адресат для корреспонденции.

в норме и при патологии. Помимо непосредственно трофической роли, нейротрофины и их рецепторы координируют нейритогенез, направленный рост нейритов, образование синаптических структур, высвобождение нейротрансмиттеров и синаптическую пластичность [1]. Внутриклеточная сигнализация нейротрофинов осуществляется за счёт связывания с рецепторами двух типов: низкоаффинного рецептора p75NTR (ген *Ngfr*), относящегося к семейству рецепторов, содержащих «домен смерти» (суперсемейство рецепторов факторов некроза опухоли TNFR); и высокоаффинных рецепторных тирозинкиназ (тропомиозин-рецепторные

киназы, Trk). В то время как p75NTR активируется всеми четырьмя нейротрофинами, рецепторы Trk более селективны к лигандам: фактор роста нервов (NGF) преимущественно связывается с TrkA (ген *Ntrk1*), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и нейротрофин-4/5 (NT-4/5) — с TrkB (ген *Ntrk2*), нейротрофин-3 (NT-3) — с TrkC (ген *Ntrk3*) [2]. Секретируемые пронеуротрофины имеют большую аффинность к рецептору p75NTR, чем зрелые формы [3]. Сигналинг нейротрофинов через p75NTR связан с индукцией апоптоза, а активация Trk, напротив, стимулирует выживание и дифференцировку нейронов [2, 4, 5]. Мембранная представленность рецепторов p75NTR и Trk может изменяться при возбуждении или повреждении нейрональных клеток [6–8], что координирует механизмы клеточного ответа и определяет функциональный эффект действия нейротрофинов.

Наши недавние исследования показали возможную связь экспрессии рецепторов нейротрофинов с функционированием урокиназной системы: CRISPR/Cas9n-опосредованный нокаут гена *Plaur*, кодирующего урокиназный рецептор (uPAR), снижал экспрессию полноразмерной формы рецептора TrkC и подавлял TrkC-зависимую внутриклеточную сигнализацию в клетках нейробластомы Neuro2a [9]. Урокиназная система является частью системы активаторов плазминогена, в состав которой входит урокиназа (uPA) и ее рецептор (uPAR), тканевой активатор плазминогена (tPA) и ингибиторы активаторов плазминогена (PAI-1 и PAI-2) [10]. В наших работах и в исследованиях других авторов была показана важная роль системы активаторов плазминогена в регуляции таких процессов в нервной системе, как формирование головного мозга в эмбриогенезе [11–13], регенерация периферических нервов [14–17], нейриогенез [18, 19], регуляция направленного роста аксонов [18, 20], ответ на генерализованные судороги и эпилептогенез [21–24], ответ на травмы и повреждения головного мозга [25–27].

Нами также было установлено, что в головном мозге взрослых животных экспрессия uPAR может регулироваться нервной активностью, уровни его мРНК многократно возрастают в ранние сроки после судорог, вызванных введением пентилентетразола; при этом *Plaur* функционирует в этих условиях в качестве непосредственного раннего гена [21]. Так как регуляция генов рецепторов нейротрофинов также изменяется под влиянием судорог [6–8, 28–30], изучение их экспрессии после генерализованной нервной активности в структурах мозга, где в это время была обнаружена активация гена *Plaur*, представляет большой интерес и может

способствовать более глубокому пониманию молекулярных и клеточных механизмов выживания и адаптивной пластичности нейронов в норме и при патологии.

В связи с этим целью данной работы было исследовать экспрессию генов рецепторов нейротрофинов *Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* в структурах головного мозга мышей на ранних сроках после вызванной введением пентилентетразола (PTZ) генерализованной нервной активности. Структуры головного мозга (передняя и задняя кора полушарий головного мозга и гиппокамп) и сроки анализа (1, 3 и 6 ч) были выбраны на основе наших предыдущих данных об индукции в этих условиях гена *Plaur* [21]. С помощью биоинформатического поиска нами также были найдены конкретные микроРНК, мишенями которых являются рецепторы нейротрофинов, и проверена зависимость их экспрессии от PTZ-индуцированной судорожной активности. Наконец, поскольку введение PTZ служит и моделью повреждения нейронов головного мозга [31, 32], мы провели оценку в исследованных структурах белков Bax и Bcl-2, как сигнальных посредников апоптоза. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в головном мозге на ранних сроках после введения PTZ происходит активация экспрессии генов рецепторов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr*, микроРНК-9 и микроРНК-29а, а также активация сигнального пути с участием белков Bcl-2 и Bax, что может характеризовать их, как важных молекулярных посредников в регуляции выживаемости и адаптации нейронов в условиях генерализованной судорожной активности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Работа с лабораторными животными и индукция генерализованных судорог.** В исследовании были использованы взрослые самцы мышей C57BL/6J в возрасте 12–14 недель весом  $28,2 \pm 3,7$  г, полученные из питомника ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Мышей содержали при стандартном 12-часовом цикле свет/темнота, постоянной температуре ( $22 \pm 1$  °C) и влажности (50–60%). Вода и еда были доступны без ограничений. Исследования планировали и проводили в соответствии с руководством PREPARE Guideline [33]. Всего было использовано 120 животных, которых распределяли в экспериментальные (1, 3, 6 ч) и контрольную (0 ч) группы случайным образом (по 4–6 мышей в группу). Генерализованные судороги вызывали введением PTZ («Sigma», США) внутрибрюшинно, как описано

ранее [34]. Доза PTZ составила 75 мг/кг массы тела, что вызывало максимальную (6 и выше баллов по модифицированной для мышей шкале Рацина [35]) выраженность судорог у большинства особей. Выделение мозга и дальнейший анализ полученных образцов проводили только у тех мышей, у которых наблюдались подобные максимально выраженные судороги. Препарат растворяли в 0,9%-ном растворе NaCl. Мышей, которым вводили физиологический раствор, использовали в качестве контроля (0 ч). В качестве временных точек для анализа были выбраны 1, 3 и 6 ч после судорог, как наиболее релевантные для изучения раннего ответа, согласно нашим данным [21]. Мышей умерщвляли путём цервикальной дислокации через соответствующие промежутки времени после начала судорог, далее декапитировали и выделяли головной мозг. Передняя кора, задняя кора, гиппокамп и стриатум были выделены, как описано ранее [36]. В качестве передней коры выделяли отделы до уровня 0 относительно точки Брегма, в качестве задней — отделы от уровня –2 мм относительно точки Брегма, согласно стандартному стереотаксическому атласу мозга мыши [37]. Образцы быстро замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С до выделения РНК и белка.

Чтобы исключить влияние мРНК клеток крови в образцах мозга, мы собирали цельную кровь подопытных мышей через 3 и 6 ч после инъекции PTZ, а также контрольных мышей в аналогичные сроки. Для каждой временной точки в группу входили 4 мыши. Приблизительно 500 мкл мышинной крови отбирали методом кардиальной пункции с помощью инсулинового шприца на 1 мл, кровь немедленно помещали в пробирки на 15 мл, содержащие 5 мкл 0,5 М ЭДТА, и тщательно перемешивали с 2 мл реагента Trizol. Тотальную РНК выделяли методом, описанным ниже.

**Культивирование эукариотических клеток.** Первичная культура эндотелиальных клеток мыши была любезно предоставлена В.Ю. Сысоевой (лаборатория морфогенеза и репарации тканей, МГУ имени М.В. Ломоносова). Клетки культивировали в среде EGM-2 («Lonza», Швейцария). Для оценки влияния PTZ на экспрессию *Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* клетки мышинного эндотелия инкубировали с PTZ в конечной концентрации 20 мМ [38, 39] в течение 1, 3 и 6 ч.

**Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.** Тотальную РНК выделяли из замороженной ткани мозга, крови и эндотелиальных клеток с помощью реагента Trizol («Invitrogen», США) в соответствии с про-

токолом производителя. Количество тотальной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Качество тотальной РНК и представленность фракции малых РНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. 1,5 мкг тотальной РНК подвергали обратной транскрипции с использованием олиго(dT) и случайных (dN)<sub>10</sub>-праймеров с помощью набора MMLVRT («Евроген», Россия). ПЦР проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR («Евроген») на приборе для ПЦР в реальном времени CFX96 («Bio-Rad», США). Используемые в работе праймеры кДНК мыши («Евроген») приведены в табл. 1 [9].

Условия проведения ПЦР включали денатурацию при 95 °С 15 мин, далее 40 циклов амплификации (денатурация 15 с при 95 °С, отжиг с праймерами 15 с при 62 °С и элонгация 20 с при 72 °С). ПЦР для каждого образца проводили в дубликатах (технические повторности). Относительный уровень транскрипта рассчитывали с использованием метода 2<sup>–ΔΔCt</sup> с геном β-актина в качестве гена сравнения, «гена домашнего хозяйства»; нормализацию проводили, принимая за единицу средний уровень каждого транскрипта в контроле (контрольные мыши без введения PTZ).

**Анализ экспрессии зрелых микроРНК.** Анализ экспрессии зрелых микроРНК проводили

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, использованных в работе

| Название праймера  | Последовательность праймеров (5'–3') |
|--------------------|--------------------------------------|
| β-актин for        | AGTGTGACGTTGACATCCGTA                |
| β-актин rev        | GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT               |
| TrkA for           | GCCTAACCATCGTGAAGAGTG                |
| TrkA rev           | CCAACGCATTTGGAGGACAGAT               |
| TrkB for           | TGGGACGTTGGGAATTTGGT                 |
| TrkB rev           | AGTTGGCGCAAAATGCACAG                 |
| TrkC for           | AGCCACGTCAACCTGACTG                  |
| TrkC rev           | CCTCGCTCGTCACGTTTAC                  |
| p75NTR for         | ACCCTGCCTGGACAGTGTTA                 |
| p75NTR rev         | AGAACACGAGTCCTGAGCCC                 |
| mmu-mir-128-3p for | AACAAGCAGTGAACCGGTCTCT               |
| mmu-mir-29a-3p for | AACAAGTAGCACCATCTGA                  |
| mmu-mir-27a-3p for | AACAAGTCACAGTGGCTAAGT                |
| mmu-mir-381-3p for | AACAAGACAAGGGCAAGCT                  |
| mmu-mir-9-5p for   | AACAAGGGTTATCTAGCTGT                 |
| SNORD68 for        | AACACGCTGATGACATTCTCCG               |

с помощью планшета «Mouse Neurological Development & Disease» ТМ («Qiagen», США), который позволяет анализировать 84 дифференциально экспрессируемых микроРНК в процессе развития нейронов или в ходе прогрессии неврологических заболеваний. Расположение анализируемых микроРНК на планшете представлено на рис. 1 в Приложении. В качестве матрицы использовали тотальную РНК из образцов ткани гиппокампа контрольной мыши и мыши через 3 ч после введения PTZ. Для обратной транскрипции использовали 2 мкг тотальной РНК и набор miScript II RT kit («Qiagen»). Условия проведения ПЦР включали предденатурацию при 95 °C 15 мин, далее 40 циклов амплификации (денатурация 15 с при 94 °C, отжиг с праймерами 15 с при 55 °C и элонгация 30 с при 70 °C). Относительный уровень транскрипта рассчитывали с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , рассчитывая геометрическое среднее по четырём малым ядрышковым РНК, выступающим в качестве референсных (SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96).

Экспрессию выбранных микроРНК подтверждали дополнительно с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы использовали тотальную РНК из образцов ткани гиппокампа 4-х контрольных мышей и 4-х мышей через 3 ч после введения PTZ. Обратную транскрипцию проводили, как описано ранее. Условия проведения ПЦР включали предденатурацию при 95 °C 15 мин, далее 40 циклов амплификации (денатурация 15 с при 94 °C, отжиг с праймерами 15 с при 51–58 °C в зависимости от пары праймеров и элонгация 30 с при 70 °C). Использованные в работе праймеры к микроРНК мыши («Евроген») приведены в табл. 1. В качестве обратных праймеров мы использовали коммерчески доступные праймеры 10x miScript universal primer из набора miScript SYBR® Green PCR Kit («Qiagen»). Относительный уровень транскрипта рассчитывали с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , с SNORD68 в качестве референса; нормализацию проводили, принимая за единицу средний уровень каждого транскрипта в контроле.

Анализ обогащения мишеней deregulированных микроРНК проводился с использованием инструмента MIENTURNET (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>) [40] (база данных miRTarBase, в которую включены экспериментально подтверждённые мишени микроРНК) с порогом минимального количества взаимодействий микроРНК–ген-мишень – 2 и порогом для скорректированного значения  $p$  (метод FDR) – 0,05. Анализ обогащения набора генов, являющихся мишенями минимум двух

dерегулированных микроРНК по базе данных miRTarBase, по функциональной принадлежности (генная онтология биологические процессы (Gene ontology:biological processes, GO:BP) и пути KEGG (Киото энциклопедия генов и геномов)), проводился с использованием онлайн инструмента g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) [41]. Анализ обогащения по транскрипционным факторам осуществляли с использованием программы GSEA 4.1.0 [42] и базы данных, полученной из TransMiR v2.0 (<http://www.cuilab.cn/transmir>) [43]. Поиск микроРНК, регулирующих нейротрофины, рецепторы нейротрофинов, Bcl-2 и Bax, осуществляли по базам данных miRTarBase (<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/>) [44], miRDB (<http://www.mirdb.org/mining.html>) [45] и TargetScanMouse ([http://www.targetscan.org/mmu\\_72/](http://www.targetscan.org/mmu_72/)) [46].

**Приготовление лизатов ткани мозга, электрофорез в полиакриламидном геле и Вестерн-блоттинг.** Ткань мозга лизировали в ледяном буфере для лизиса RIPA (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 0,5% дезоксихолата натрия, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, pH 7,4), содержащем коктейль ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific»). Для лизирования 10 мг ткани мозга использовали 100 мкл буфера RIPA. Ткань мозга гомогенизировали путём ручного измельчения холодным пестиком и пропускания 10 раз через иглу 27G инсулинового шприца. Лизаты инкубировали 20 мин на льду, периодически перемешивая, далее центрифугировали при +4 °C в течение 20 мин при 16 000 g. Супернатант переносили в новую предварительно охлажденную пробирку, осадок клеток выбрасывали. 5 мкл супернатанта, разведенного 1/1000, использовали для количественной оценки концентрации белка по методу Бредфорда («BioRad»), после чего образцы смешивали с равным объемом 2-кратного буфера Лэммли, содержащего 10% меркаптоэтанол, и нагревали при 95 °C в течение 10 мин. Белки (40 мкг/дорожка) разделяли в 10%-ном SDS-PAGE и переносили на PVDF-мембрану («GE Healthcare», США) в буфере для переноса (1,92 M Tris/глициновый буфер, 0,1% SDS, 20% метанол). Неспецифическое связывание блокировали в 5%-ном обезжиренном сухом молоке в фосфатно-солевом буфере PBS, («Sigma-Aldrich», США), содержащем 0,1% (v/v) Tween-20 при +4 °C в течение ночи. Мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре со следующими первичными антителами (все разведения 1/1000): мышинные анти-Bax («Santa Cruz», США) и мышинные анти-Bcl-2 («Santa Cruz»). Мембраны промывали PBS, содержащим 0,1% (v/v) Tween-20, и инкубировали с соответствующими вторичными антителами («Imtek»,

Россия), конъюгированными с пероксидазой, в разведении 1/10 000 при комнатной температуре в течение 1,5 ч с последующей промывкой в PBS, содержащем 0,1% (v/v) Tween-20. Белки визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Dura («Thermo Fisher Scientific») и системы ChemiDoc™ XRS+ («Bio-Rad»). Денситометрический анализ блотов проводили в ImageJ.

**Статистический анализ.** Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Непарный *t*-тест Стьюдента с нулевой гипотезой о равных средних в двух выборках использовался для сравнения данных между двумя группами. Различия между несколькими группами определяли, используя односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с нулевой гипотезой о равных средних между группами. Тест использует распределение Фишера–Снедекора (*F*-распределение), и когда значение *F* было критическим (уровень значимости  $p < 0,05$ ), сравнения каждой экспериментальной группы с контролем дополнительно анализировали с использованием апостериорного теста Даннета для анализа множественных сравнений. В тексте приведены значения *F*, межгрупповое и внутригрупповое число степеней свободы и уровень значимости  $p$  апостериорных тестов. Сравнение экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* в отделах головного мозга проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки (для сравнения нескольких групп). Соотношение Bcl-2/Bax сравнивали с помощью 2-way ANOVA с использованием апостериорного теста Холма–Сидака (для сравнения двух групп). Критическим уровнем значимости считали  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Пространственный и временной профиль экспрессии мРНК *Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* в головном мозге мышей при индукции судорожной активности.** Оценка экспрессии мРНК рецепторов нейротрофинов (TrkA, TrkB, TrkC, p75NTR) была проведена на ранних сроках после индукции судорог (1, 3 и 6 ч после введения PTZ), так как ранее на этой модели нами было показано, что пик ранней активации генов происходит через 3 ч после судорог [21].

Было обнаружено, что экспрессия мРНК *Ntrk2* существенно возрастает через 3 и 6 ч после введения PTZ в передней коре (рис. 1, *a*,

$F_{3,12} = 11,10$ ,  $p = 0,0039$  и  $p = 0,0113$  соответственно). В задней коре в исследуемых промежутках времени после индукции судорог уровень экспрессии *Ntrk2* не изменялся (рис. 1, *б*,  $F_{3,13} = 2,027$ ). В гиппокампе наблюдалось двухфазное повышение мРНК *Ntrk2* через 1 и 6 ч после индукции судорожной активности (рис. 1, *в*,  $F_{3,17} = 9,927$ ,  $p = 0,0073$  и  $p = 0,0028$  соответственно).

Было обнаружено, что экспрессия мРНК *Ntrk3* (TrkC) активировалась через 1, 3 и 6 ч после введения PTZ, при этом характер его активации различался в исследуемых областях мозга – передняя кора, задняя кора, гиппокамп (рис. 2). В передней коре и гиппокампе повышение мРНК *Ntrk3* наблюдалось через 3 ч после индукции судорожной активности (рис. 2, *a*,  $F_{3,16} = 14,66$ ,  $p = 0,0009$ ; рис. 2, *в*,  $F_{3,17} = 14,36$ ,  $p < 0,0001$  соответственно). В задней коре уровень экспрессии гена *Ntrk3* возрастал уже через 1 ч после индукции судорожной активности (рис. 2, *б*,  $F_{3,17} = 10,24$ ,  $p = 0,0017$  и  $F_{3,16} = 3,439$ ,  $p = 0,0334$  соответственно) и оставался повышенным спустя 3 ч ( $p = 0,0014$  и  $p = 0,0434$  соответственно) и 6 ч после судорог ( $p = 0,0003$ ).

Экспрессия мРНК *Ngfr* (p75NTR) также была активирована в те же сроки в передней коре, задней коре и гиппокампе (рис. 3). Профиль экспрессии мРНК *Ngfr* различался между исследованными областями мозга. В передней коре и в гиппокампе экспрессия гена *Ngfr* индуцировалась через 3 ч после индукции судорожной активности (рис. 3, *a*,  $F_{3,14} = 8,948$ ,  $p = 0,0179$  и рис. 3, *в*,  $F_{3,15} = 19,52$ ,  $p < 0,0001$  соответственно). Ранняя активация наблюдалась в задней коре головного мозга через 1 ч после индукции судорожной активности (рис. 3, *б*,  $F_{3,17} = 9,859$ ,  $p = 0,0441$ ), экспрессия оставалась повышенной через 3 ч ( $p = 0,0006$ ) и через 6 ч ( $p = 0,0005$ ) после введения PTZ.

Значимых изменений в экспрессии мРНК *Ntrk1* (TrkA) в передней коре ( $F_{3,16} = 0,3484$ ) и задней коре ( $F_{3,17} = 3,839$ , апостериорный тест Даннета  $p > 0,05$ ) в течение 1–6 ч после индукции судорожной активности нейронов не наблюдалось (рис. 4). Экспрессия мРНК *Ntrk1* в гиппокампе была на нерепрезентативно низком уровне, в связи с чем данные не приводятся.

Чтобы подтвердить, что изменения в экспрессии генов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* не обусловлены клетками крови и клетками сосудов головного мозга, а соответствуют ткани мозга, мы проанализировали уровень экспрессии тех же генов в крови и мышине эндотелии в соответствующие моменты времени. Экспрессия *Ntrk3* и *Ngfr* в крови мышей не изменялась через 3–6 ч

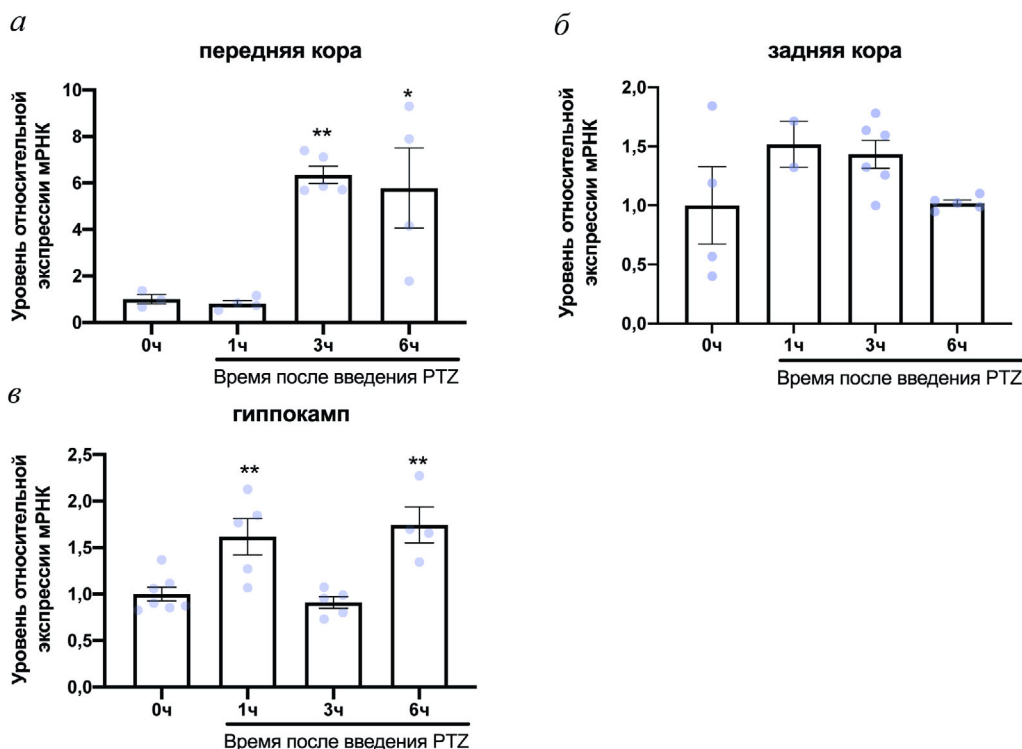
***Ntrk2* (TrkB)**

**Рис. 1.** Изменения экспрессии мРНК *Ntrk2* (TrkB) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б), в гиппокампе (в). 0 ч — контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Данные представлены как среднее значение экспрессии  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

после PTZ-индуцированных судорог ( $F_{2,9} = 1,036$  и  $F_{2,10} = 3,701$ , рис. 2, а и б соответственно в Приложении). Обработка первичной культуры клеток мышиного эндотелия PTZ также не влияла на экспрессию *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* (рис. 2, с–е соответственно в Приложении). В связи с этим мы имеем основания полагать, что увеличение экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* происходит непосредственно в ткани мозга.

Таким образом, мы показали, что в достаточно короткие сроки (1–6 ч) после введения PTZ в передней, задней коре головного мозга и гиппокампе мышей индуцируется экспрессия генов рецепторов нейротрофинов *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr*, что отражает их участие в регуляции функционирования нервной ткани в ответ на стимулированную активность. Примечательно, что динамика изменения экспрессии рецепторов нейротрофинов различалась между исследуемыми отделами головного мозга: если в передней коре через 3–6 ч в большей степени происходила индукция *Ntrk2* (2-way ANOVA, 3 и 6 ч *Ntrk2* против *Ntrk3* и *Ntrk2* против *Ngfr*,  $p < 0,0001$ ), описанной функцией которого является регуляция выживаемости, то в задней коре через 3–6 ч в боль-

шей степени происходила индукция *Ngfr*, регулирующего гибель (2-way ANOVA, 3 и 6 ч *Ntrk3* против *Ngfr* и *Ntrk2* против *Ngfr*,  $p < 0,0001$ ) (рис. 5). В гиппокампе основная волна индукции экспрессии рецепторов нейротрофинов была короче и приходилась на 3 ч, где возрастала экспрессия как *Ntrk3*, так и *Ngfr* (2-way ANOVA, 3 ч *Ntrk3* против *Ntrk2* и *Ngfr* против *Ntrk2*,  $p < 0,0001$ ). Чтобы понять, коррелируют ли наблюдаемые нами изменения экспрессии рецепторов нейротрофинов с соответствующей клеточной сигнализацией в разных отделах головного мозга в те же сроки (3 и 6 ч), мы далее провели анализ экспрессии белков Bcl-2 и Bax — внутриклеточных сигнальных эффекторов выживаемости и гибели клеток.

**Оценка сигнального пути с участием белков апоптоза Bcl-2 и Bax в головном мозге после индукции судорожной активности.** В процессах, опосредующих пластические реакции и выживаемость нейронов, внутриклеточная сигнализация через TrkB и TrkC сопряжена, в частности, с увеличением экспрессии анти-апоптотического белка Bcl-2 и/или увеличением соотношения Bcl-2/Bax [47–49]. Напротив, снижение

соотношения Bcl-2/Bax отражает запуск нейрональной гибели, что характерно для сигнализации p75NTR [50]. Поэтому далее мы оценили изменение содержания Bcl-2 и его адаптерного про-апоптотического белка Bax в передней, задней коре и в гиппокампе через 3 и 6 ч после PTZ-индуцированных судорог (рис. 6). Через 3 ч после индукции экспрессия Bcl-2 в трёх анализируемых отделах головного мозга практически не изменялась (рис. 6, а; рис. 3, а в Приложении). Экспрессия Bax, напротив, снижалась через 3 ч в передней и задней коре, но не в гиппокампе, по сравнению с контролем (рис. 6, а; рис. 3, а в Приложении). Через 6 ч после активации нейронов наблюдалась большая вариативность между образцами нервной ткани. Но в среднем экспрессия Bcl-2 возрастала в передней и задней коре и практически не изменялась в гиппокампе; экспрессия Bax через 6 ч практически не изменялась в трёх анализируемых отделах головного мозга (рис. 6, в; рис. 3, б в Приложении).

Мы также проанализировали соотношение Bcl-2/Bax, которое может определять выживаемость клеток [48, 51, 52]. Оказалось, что это соотношение возрастает в передней и задней коре после индукции генерализованной судорожной активности (2-way ANOVA 0 ч, 3 ч: фактор времени  $F_{1,8} = 36,73$ ; фактор зоны головного мозга  $F_{2,8} = 31,58$ ; взаимодействие  $F_{2,8} = 10,34$ ; тест Холма–Сидака 0 ч против 3 ч: передняя кора  $p = 0,0019$ , задняя кора  $p = 0,0019$ , гиппокамп  $p = 0,8777$ ), что отражает сдвиг к сигналу о «выживании», но практически не изменяется в гиппокампе (рис. 6, б и г).

Эти данные указывают на то, что прямой корреляции между экспрессией мРНК рецепторов нейротрофинов и сигнализацией выживаемости в ранние сроки не прослеживается. В передней коре происходит существенная и преимущественная индукция *Ntrk2*, что согласуется со значительным увеличением соотношения Bcl-2/Bax. В задней коре в большей степени возрастает экспрессия *Ngfr*, однако происходит

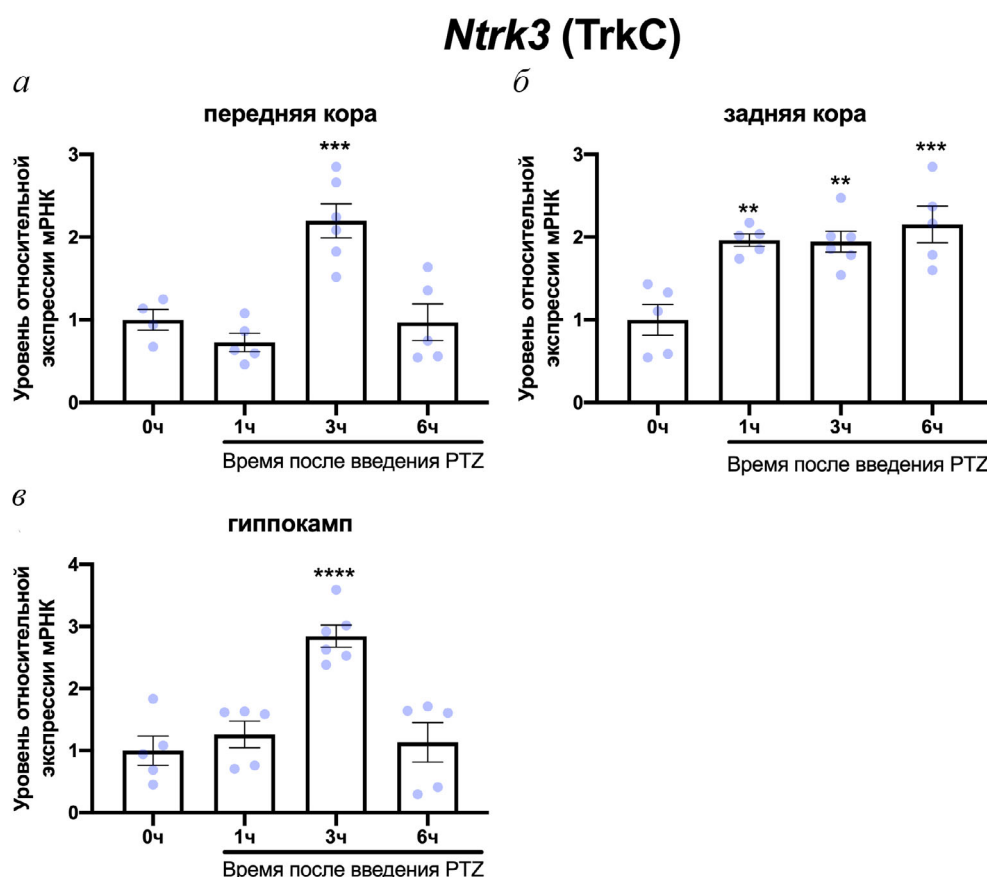


**Рис. 2.** Изменения экспрессии мРНК *Ntrk3* (TrkC) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б), в гиппокампе (в). 0 ч — контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Данные представлены как среднее значение экспрессии  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

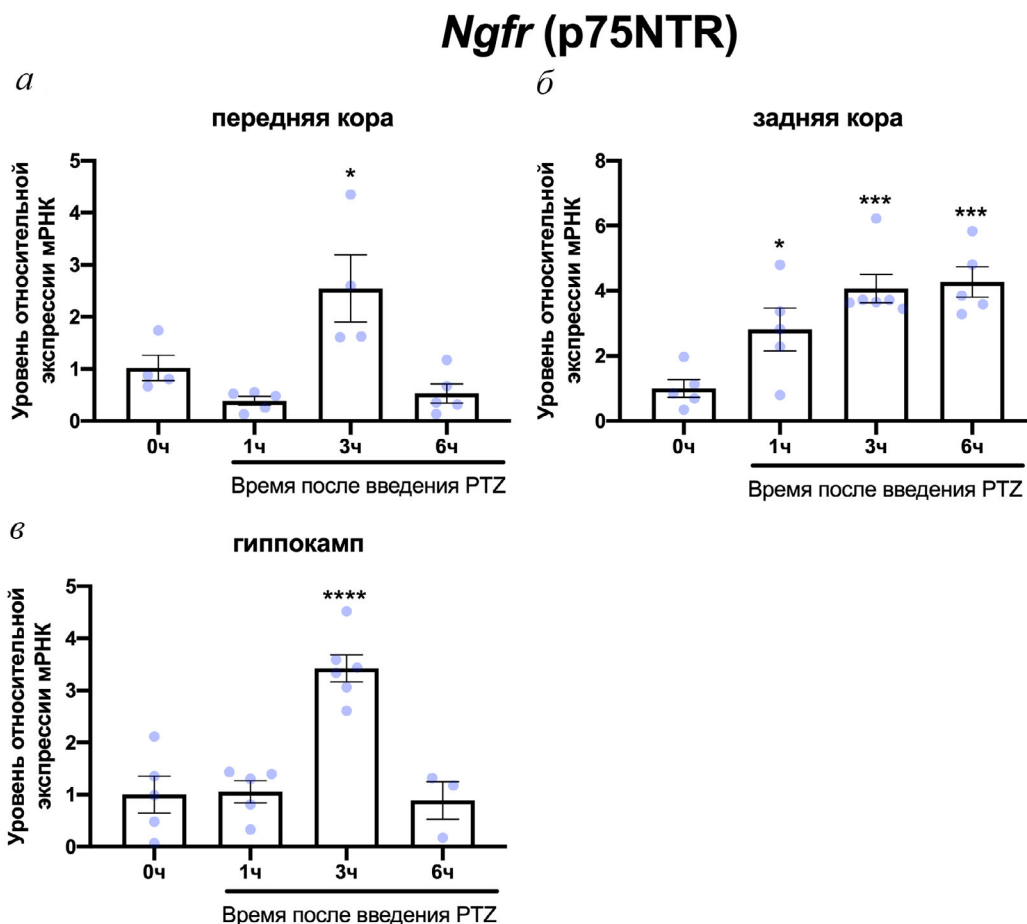


**Рис. 3.** Изменения экспрессии мРНК *Ngfr* (p75NTR) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (*a*), в задней коре (*б*), в гиппокампе (*в*). 0 ч – контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Данные представлены как среднее значение экспрессии  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

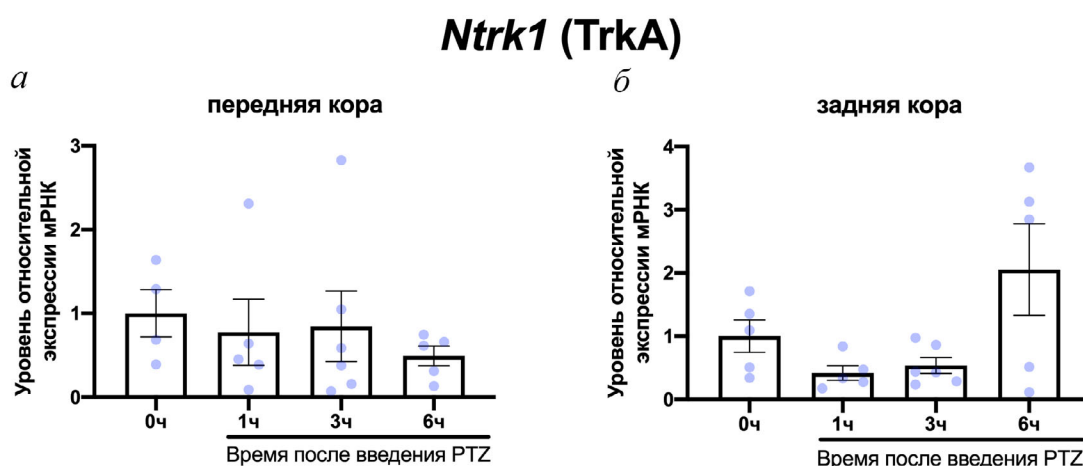


**Рис. 4.** Изменения экспрессии мРНК *Ntrk1* (TrkA) после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (*a*) и в задней коре (*б*). 0 ч – контрольные мыши. ANOVA, апостериорный тест Даннета, статистически значимых изменений не обнаружено. Данные представлены как среднее значение экспрессии  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

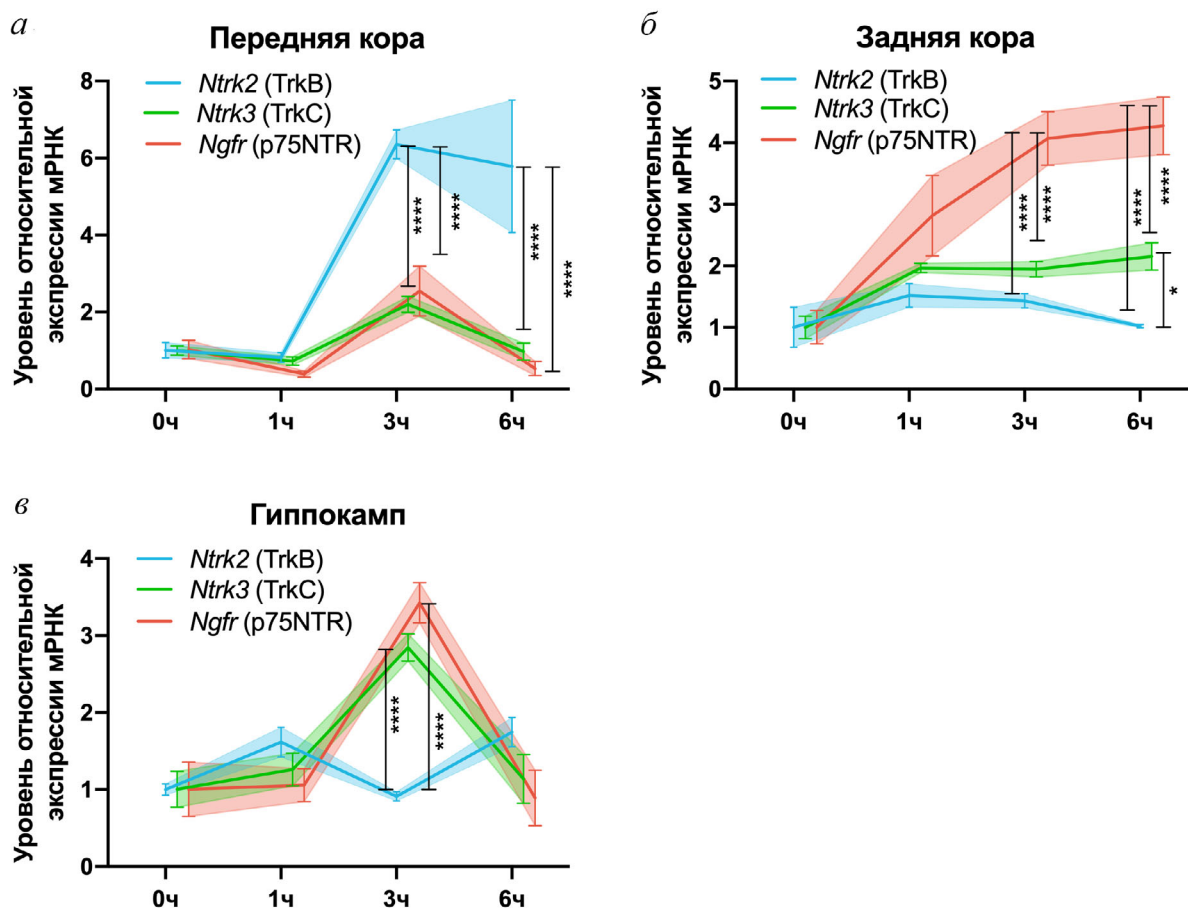


**Рис. 5.** Суммарные изменения экспрессии мРНК *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* после введения пентилентетразола (PTZ): в передней коре (а), в задней коре (б) и в гиппокампе (в). 0 ч — контрольные мыши. 2-way ANOVA, апостериорный тест Тьюки, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Данные представлены как среднее значение экспрессии  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM)

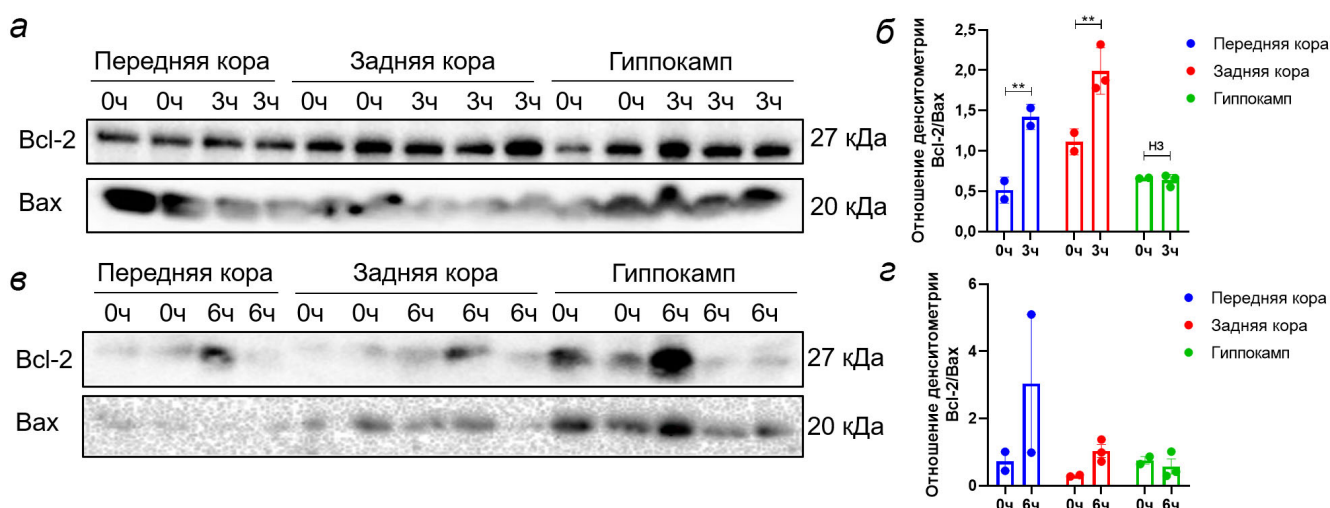


**Рис. 6.** Анализ изменения экспрессии Bcl-2 и Bax после индукции генерализованной судорожной активности. 0 ч — контрольные мыши. Анализ проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием лизатов передней и задней коры и гиппокампа через 3 ч (а и б) и 6 ч (в и г) после индукции активации нейронов. б и г — Анализ отношения денситометрии экспрессии Bcl-2 к белку Bax в разных отделах головного мозга. На дорожку наносили одинаковое количество белка (40 мкг). 2-way ANOVA, апостериорный тест Холма—Сидака: нз — незначимо, \*\*  $p < 0,01$

также увеличение экспрессии *Ntrk3*, который, предположительно, может быть функционально значимым и способствует активации соответствующего сигналинга, что выражается в повышении соотношения Bcl-2/Bax. Напротив, в гиппокампе через 3 ч одинаково индуцируются *Ntrk3* и *Ngfr*, но конечное соотношение Bcl-2/Bax не изменяется, что может говорить о том, что сигналы от *Ntrk3* и *Ngfr* «уравновешивают» друг друга, либо их индукция не является функционально значимой, либо в регуляцию клеточного ответа гиппокампа вовлечены другие механизмы. Так как известно, что микроРНК могут участвовать в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов [53], в том числе генов рецепторов нейротрофинов [54], мы предположили, что в гиппокампе могут быть задействованы дополнительные механизмы регуляции нейронального ответа на возбуждение и повреждение, связанные с микроРНК. Поэтому далее мы проанализировали экспрессию микроРНК в норме и через 3 ч после судорожной активации нейронов в гиппокампе.

**Оценка профиля экспрессии микроРНК в гиппокампе мышей при судорожной активности.** Для анализа экспрессии микроРНК мы выбрали временной интервал 3 ч и зону гиппокампа, где наблюдалась значительная индукция экспрессии *Ntrk3* и *Ngfr*. Мы проанализировали экспрессию 84 микроРНК, наиболее изученных в контексте нейробиологии (рис. 1 в Приложении). Мы обнаружили, что через 3 ч после PTZ-индуцированной активации нейронов происходит индукция экспрессии основной части исследуемых микроРНК (рис. 7, а). Из 84 проанализированных микроРНК экспрессия 43 (51%) повышалась как минимум в 2 раза, и экспрессия только одной микроРНК снизилась более чем в 2 раза (рис. 7, б).

Анализ обогащения мишеней микроРНК выявил 105 генов, являющихся мишенями как минимум двух deregulированных микроРНК, и 64 гена, являющихся мишенями трёх и более deregulированных микроРНК (рис. 4 в Приложении). Анализ обогащения этих генов по функциональным и метаболическим характеристикам показал высокую представленность таких биологических процессов (GO:BP), как: сигнальный путь рецепторных тирозинкиназ, активируемых коллагеном; ангиогенез; организация внеклеточного матрикса; дифференцировка клеток; клеточный стресс-ответ на кислотные химические вещества. Анализ обогащения этих генов по KEGG-путям показал перепредставленность путей фокальной адгезии, взаимодействия рецепторов с внеклеточным матриксом, сигнального пути PI3K-Akt, сигнального пути

релаксина (рис. 7, в). Семейство релаксина включает разные активные сигнальные пептиды, синтезируемые в разных органах, в частности, релаксин-3 синтезируется в нейронах и модулирует стресс-ответ, метаболизм и поведенческие реакции [55].

Мы также проанализировали обогащение по транскрипционным факторам и выявили 22 потенциальных транскрипционных фактора, которые могут регулировать экспрессию микроРНК на раннем этапе нейрональной активности (рис. 7, г; рис. 5 в Приложении).

Известно, что микроРНК могут служить своеобразными буферами, уравновешивающими скачки активации транскрипции генов [56], поэтому их ранняя индукция при судорожной активности может быть важна для гомеостатического контроля экспрессии индуцируемых генов. В связи с этим мы предположили, что нейротрофины и рецепторы нейротрофинов, экспрессия которых возрастает через 1–3 ч и далее падает до первоначального уровня к 6 ч в гиппокампе после введения PTZ, могут быть мишенями этих микроРНК. В результате поиска в базах данных мишеней микроРНК мы обнаружили, что TrkB и TrkC могут быть мишенью 8 deregulированных микроРНК, p75NTR – 2 микроРНК, NGF – 3 микроРНК, BDNF – 6 микроРНК, Bcl-2 – 5 микроРНК, Bax – 1 микроРНК (табл. 2). TrkA, нейротрофины NT-3 и NT-4/5 не были обнаружены в качестве мишеней индуцированных микроРНК. Таким образом, в гиппокампе ранняя волна индукции экспрессии генов TrkB (через 1 ч), TrkC и p75NTR (через 3 ч) коррелирует с индукцией ряда микроРНК, нацеленных на подавление этих генов, что может объяснить последующее снижение уровня транскрипции этих генов до их базовых значений и отсутствие значимого изменения соотношения Bcl-2/Bax. Это может отражать механизм «уравновешивания» генного ответа. Базы данных, являющиеся источником указанных взаимодействий микроРНК–мишень, и их предсказательные оценки указаны в таблице в Приложении.

Для подтверждения полученных результатов и нашей гипотезы о ко-индукции микроРНК и генов-мишеней, мы проанализировали в гиппокампе экспрессию микроРНК, мишенями которых могут быть TrkB (*mmu-miR-128-3p*), TrkC (*mmu-miR-29a-3p*, *mmu-miR-9-5p*, *mmu-miR-128-3p*, *mmu-miR-381-3p*) и p75NTR (*mmu-miR-128-3p*, *mmu-miR-27a-3p*) (рис. 8). Нами было обнаружено достоверное увеличение экспрессии *mmu-miR-29a-3p* ( $t_6 = 3,599$ ,  $p = 0,0114$ , рис. 8, а) и *mmu-miR-9-5p* ( $t_6 = 2,711$ ,  $p = 0,0351$ , рис. 8, б) в гиппокампе через 3 ч пос-

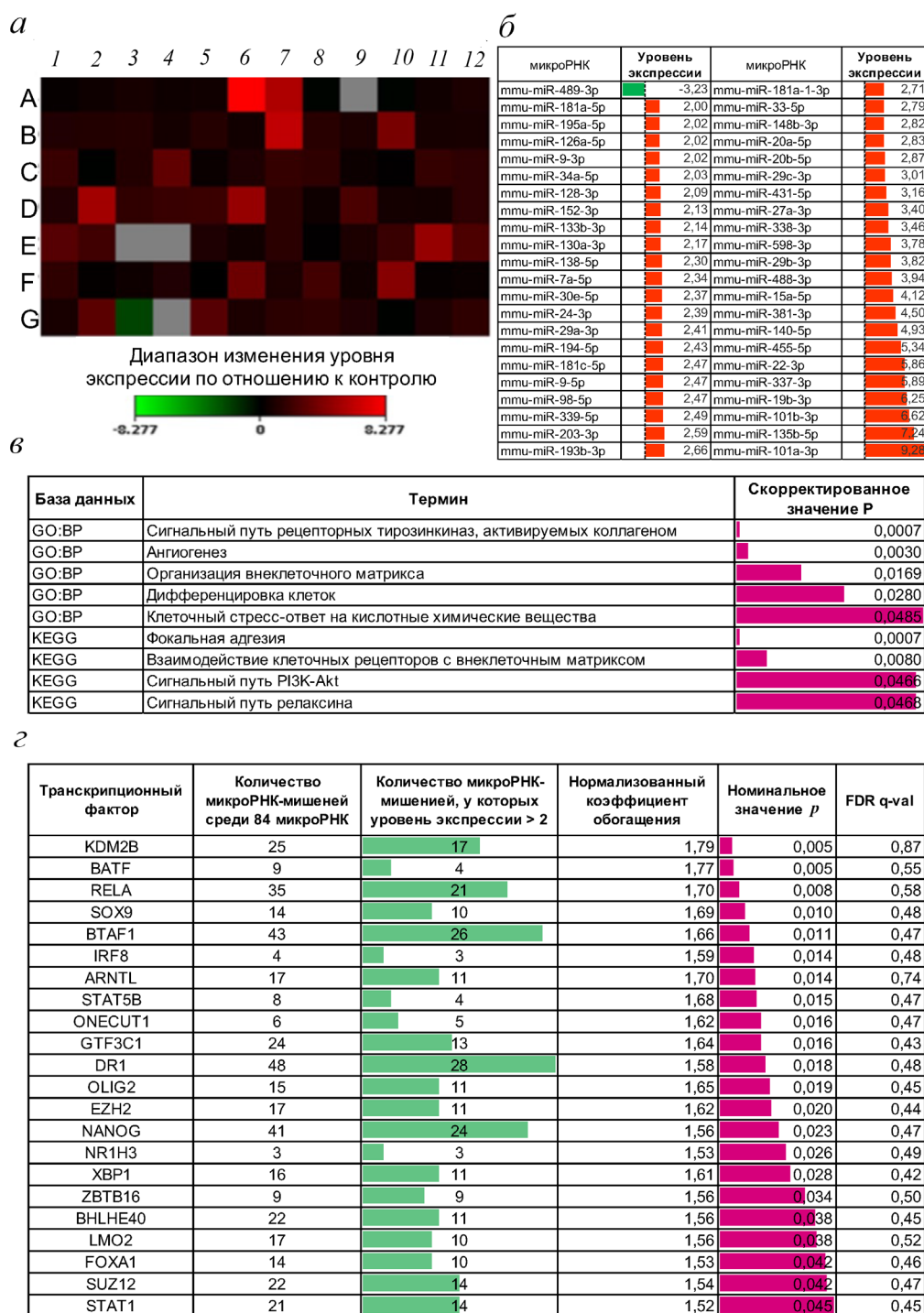


**Рис. 7.** Оценка изменения микроРНК в гиппокампе через 3 ч после индукции судорожной активности. Оценку уровня экспрессии проводили на планшете «Mouse Neurological Development & Disease» (№ MIMM-107ZA). **а** – Тепловая карта уровня экспрессии 84 микроРНК. Красным цветом обозначены микроРНК, экспрессия которых повысилась; зеленым цветом обозначены микроРНК, экспрессия которых снизилась; серым цветом обозначены микроРНК, экспрессия которых находится на предельно низком уровне как в экспериментальном, так и в контрольном образце ( $St > 35$  цикла). Цветовая градиация тепловой карты соответствует изменению уровня экспрессии микроРНК, выраженного как соотношение нормализованной экспрессии гена в экспериментальном образце к нормализованной экспрессии гена в контрольном образце ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). **б** – Список микроРНК, экспрессия которых изменялась более, чем в 2 раза. **в** – Анализ обогащения генов, являющихся мишенями как минимум двух deregulированных микроРНК, относящихся к генам, участвующим в регуляции функционального состояния и метаболизма клеток (генная онтология: биологические процессы (Gene ontology: biological processes, GO:BP) и к генам, участвующим в путях базы данных KEGG (Киото энциклопедия генов и геномов)). **г** – Анализ обогащения транскрипционных факторов, регулирующих микроРНК

**Таблица 2.** Гены-мишени для микроРНК, экспрессия которых увеличивается в гиппокампе не менее чем в 2 раза через 3 ч после введения PTZ

| МикроРНК        | Уровень увеличения экспрессии | TrkB<br><i>Ntrk2</i> | TrkC<br><i>Ntrk3</i> | p75NTR<br><i>Ngfr</i> | NGF<br><i>Ngf</i> | BDNF<br><i>Bdnf</i> | Bcl-2<br><i>Bcl2</i> | Bax<br><i>Bax</i> |
|-----------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| mmu-miR-101a-3p | 9,28                          | +                    |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-135b-5p | 7,24                          | +                    |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-19b-3p  | 6,25                          |                      | +                    |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-22-3p   | 5,86                          | +                    |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-140-5p  | 4,93                          |                      |                      |                       | +                 |                     |                      |                   |
| mmu-miR-381-3p  | 4,50                          |                      | +                    |                       |                   | +                   |                      |                   |
| mmu-miR-15a-5p  | 4,12                          |                      |                      |                       |                   | +                   | +                    |                   |
| mmu-miR-29b-3p  | 3,82                          |                      | +                    |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-338-3p  | 3,46                          | +                    |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-27a-3p  | 3,40                          |                      |                      | +                     |                   |                     |                      | +                 |
| mmu-miR-29c-3p  | 3,01                          |                      | +                    |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-20b-5p  | 2,87                          |                      | +                    |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-339-5p  | 2,49                          |                      |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-9-5p    | 2,47                          |                      | +                    |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-98-5p   | 2,47                          |                      |                      |                       | +                 |                     |                      |                   |
| mmu-miR-29a-3p  | 2,41                          |                      | +                    |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-24-3p   | 2,39                          | +                    |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-30e-5p  | 2,37                          |                      |                      |                       | +                 | +                   | +                    |                   |
| mmu-miR-138-5p  | 2,30                          | +                    |                      |                       |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-128-3p  | 2,09                          | +                    | +                    | +                     |                   |                     |                      |                   |
| mmu-miR-34a-5p  | 2,03                          |                      |                      |                       |                   | +                   | +                    |                   |
| mmu-miR-126a-5p | 2,02                          |                      |                      |                       |                   | +                   |                      |                   |
| mmu-miR-195a-5p | 2,02                          |                      |                      |                       |                   | +                   | +                    |                   |
| mmu-miR-181a-5p | 2,00                          | +                    |                      |                       |                   |                     | +                    |                   |

Примечание. Знаком + обозначены микроРНК, регулирующие соответствующий ген. TrkA, нейротрофины NT-3 и NT-4/5 не были обнаружены в качестве мишеней индуцированных микроРНК. Поиск мишеней микроРНК осуществляли по базам данных miRTarBase, miRDB и TargetScan.

ле индукции судорог по сравнению с контролем. Мы также обнаружили тенденцию к увеличению экспрессии mmi-miR-128-3p ( $t_6 = 1,463$ ,  $p = 0,1939$ , рис. 8, в) и mmi-miR-27a-3p ( $t_6 = 1,818$ ,  $p = 0,1189$ , рис. 8, г), которая не была статистически значимой ввиду большого разброса экспрессии между животными. Мы не обнаружили значимых изменений в экспрессии mmi-miR-381-3p ( $t_6 = 1,186$ ,  $p = 0,2805$ , рис. 8, д).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе был исследован транскрипционный ответ генов рецепторов нейротрофинов на PTZ-индуцированную судорожную активность в передней и задней коре и в

гиппокампе мозга мышей. Обнаружено, что экспрессия *Ntrk2* возрастает в передней коре через 3–6 ч, а в гиппокампе индукция экспрессии этого гена наблюдается через 1 и 6 ч; экспрессия *Ntrk3* и *Ngfr* возрастает во всех исследованных областях головного мозга через 3 ч, экспрессия *Ntrk1* значимо не изменяется. Такая ранняя индукция экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* характеризует их как гены, входящие в волну раннего генного ответа на нейрональную активность, что, как правило, связано с вовлечением подобных генов в механизмы нейрональной пластичности [57].

Рецепторы нейротрофинов являются важным звеном патогенеза в развитии эпилепсии [58], однако их функциональная роль в нейронах при эпилептических состояниях неодноз-

начна. Об изменении экспрессии рецепторов нейротрофинов после судорог неоднократно сообщалось ранее [6–8]. Активация рецепторов TrkC связана с выживанием, дифференцировкой нейронов [4, 5] и снижением предрасположенности к судорогам [59, 60]. Напротив, активация низкоаффинного рецептора p75NTR вызывает апоптотическую гибель нейронов [4, 61] и может приводить к повышенной возбудимости нейронов, что обуславливает предрасположенность к судорогам [62]. Экспериментальные доказательства индукции экспрессии TrkC при генерализованной судорожной активности противоречивы: так, в зависимости от различных способов индукции судорог динамика экспрессии TrkC в зубчатой извилине гиппокампа может варьироваться в течение 2–12 ч [28–30]. Наши исследования показали, что экспрессия мРНК *Ntrk3* варьируется между отделами и через 3 ч после индукции судорог достигает максимальных значений в гиппокампе — в 3 раза больше по сравнению с интактным мозгом, при этом высокие значения *Ntrk3* наблюдаются в период 1–6 ч после индукции судорог. При этом в гиппокампе, в отличие от передней и задней коры, через 3 и 6 ч после индукции судорожной

активности не происходит изменения экспрессии и соотношения Bcl-2/Bax, определяющего выживаемость нейронов [51]. Не исключено, что такое различие может определять более высокую предрасположенность нейронов гиппокампа к гибели в результате судорожной активности по сравнению с корковыми нейронами [63, 64].

Падение экспрессии рецепторов нейротрофинов в гиппокампе до контрольных значений уже к шести часам после индукции судорог может указывать на то, что их экспрессия негативно регулируется микроРНК, мишенями которых они являются. Кроме того, отсутствие раннего запуска сигнала о «выживании» в гиппокампе может также быть связано с индукцией микроРНК, мишенями которых являются нейротрофины и их высокоаффинные рецепторы. Так как известно, что экспрессия генов нейротрофинового семейства может находиться под контролем микроРНК [54], то далее мы проанализировали экспрессию микроРНК в норме и через 3 ч после PTZ-индуцированной активации нейронов в гиппокампе.

При анализе экспрессии 84 микроРНК в гиппокампе через 3 ч после введения PTZ мы

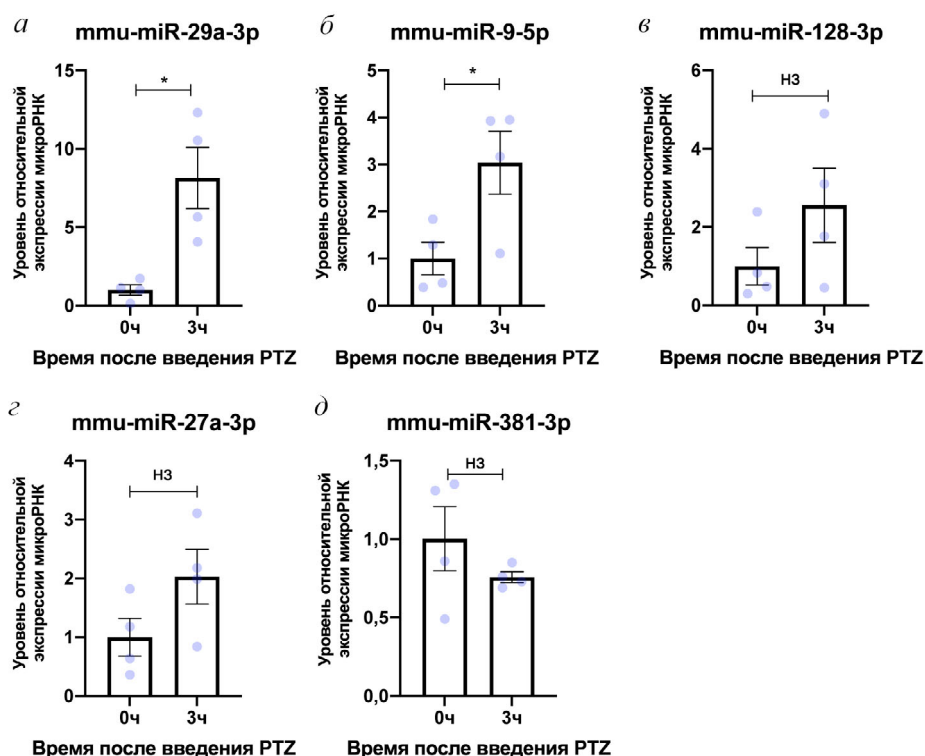


**Рис. 8.** Анализ экспрессии выбранных микроРНК после индукции генерализованной судорожной активности в гиппокампе. 0 ч — контрольные мыши. \*  $p < 0,05$ ,  $t$ -тест Стьюдента. Данные представлены как среднее значение экспрессии  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM), точки отражают индивидуальные независимые биологические повторности (разные животные)

наблюдали индукцию 43 микроРНК (повышение экспрессии как минимум в 2 раза), и экспрессия одной микроРНК снизилась более чем в 2 раза. Примечательно, что значимая индукция наблюдалась у двух микроРНК — *mtmiR-29a-3p* и *mtmiR-9-5p*. Для этих микроРНК описан целый ряд эффектов в нервной системе: известно изменение их экспрессии в ряде нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, хорей Гентингтона, боковой амиотрофический склероз и др.) [65–68], обсуждается возможность использования микроРНК-29a и микроРНК-9 в качестве биомаркеров некоторых патологий, например, болезни Альцгеймера [69]. Есть работы, указывающие на протективную функцию этих микроРНК в головном мозге: было показано, что экспрессия микроРНК-9 подавляет накопление белка прогерина в нейронах и снижает его токсический эффект при синдроме Гетчинсона–Гилфорда [70, 71], а потеря экспрессии микроРНК-29a в головном мозге мышей вызывает массивную апоптотическую гибель клеток в гиппокампе и мозжечке и выраженную атаксию [72]. При этом мишенями микроРНК-29 в нейронах могут быть как анти-апоптотические, так и про-апоптотические белки семейства Bcl-2 [73]. На модели депрессии у крыс показано участие микроРНК-9 в снижении соотношения Bcl-2/Bax и апоптозе нейронов [74].

При судорогах описано изменение уровней целого ряда микроРНК [75, 76], тем не менее информация о микроРНК-29a и микроРНК-9 в контексте PTZ-индуцированных судорог встречается редко. Изменение экспрессии *mtmiR-29a-3p* (как увеличение, так и снижение) наблюдалось на модели судорог у мышей и крыс в сроки от 6 ч до 1 недели [76–78]. Повышение *mtmiR-9-5p* было описано только через 3 дня после эпилептического статуса у мышей в зубчатой извилине [78]. Наши данные показывают, что индукция этих микроРНК может происходить в гораздо более ранние сроки (3 ч) после генерализованной судорожной активности, что указывает на их возможное участие в развитии раннего клеточного ответа на судороги и регуляции процессов нейрональной выживаемости.

Идентификация ранних транскрипционных факторов, отвечающих за индукцию микроРНК при нейрональной активации, требует дальнейшего изучения, т.к. классические ранние транскрипционные факторы *c-Fos*, *c-Jun*, *Egr-1* [79] не были перепредставлены в нашем анализе транскрипционных факторов. Ранняя индукция *mtmiR-29a-3p* и *mtmiR-9-5p* в ткани гиппокампа предполагает их возможное участие в

контроле над экспрессией индуцируемых генов (например, обнаруженной нами индукцией *Ntrk3*), что необходимо для тонкой балансировки процессов транскрипции. В работе Fiorenza et al. [80] было показано, что у мышей с индуцибельным нокаутом Dicer (нуклеаза, отвечающая за образование микроРНК) отмечаются большая подверженность индуцированным судорогам и нейродегенерация. Через 2 ч после судорог у Dicer-нокаутных мышей уровни мРНК непосредственных ранних генов были гораздо выше, чем у контрольных мышей, что подтверждает гипотезу о том, что ранняя экспрессия микроРНК в ответ на нейрональную активацию важна для «приглушения» транскрипционного ответа. Наблюдавшееся нами падение экспрессии рецепторов нейротрофинов в гиппокампе до контрольных значений уже к 6 ч после индукции судорог может относиться к такому случаю регуляции. Помимо этого, известно, что микроРНК могут вызывать репрессию трансляции своих мишеней [81], поэтому индукция микроРНК *mtmiR-9-5p*, предсказанной мишенью которой является tPA, может объяснить ранее отмеченное нами отсутствие изменения экспрессии тканевого активатора плазминогена tPA на уровне белка при значительной индукции его на уровне мРНК [21].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что судорожная нервная активность способна запускать дифференциальную регуляцию генов рецепторов нейротрофинов и микроРНК, сцепленных с функциями выживания нейронов и их адаптацией к клеточному стрессу. При этом в клетках коры головного мозга, но не в гиппокампе, происходит запуск гомеостатических каскадов выживаемости с участием белков Bcl-2 и Bax, что может обуславливать более высокий риск клеточной гибели у нейронов гиппокампа по сравнению с корой. В совокупности результаты нашего исследования привлекают большее внимание к регуляции экспрессии генов нейротрофиновых рецепторов и регуляторных микроРНК на ранних сроках после эпизодов нейрональной активации. При этом наблюдавшаяся нами индукция экспрессии *Ntrk2*, *Ntrk3* и *Ngfr* как в передней и задней коре, так и в гиппокампе, может говорить о том, что индукция экспрессии генов рецепторов нейротрофинов является достаточно универсальным ранним ответом на нейрональную активность в разных отделах головного мозга. Задачи, актуальные в этой области для последующего изучения, включают определение точных сроков начала транскрипции генов рецепторов нейротрофинов после активации нейронов и зависимость этой индукции от

*de novo* синтеза белка, т.е. соответствие этих генов критериям непосредственных ранних генов в данной ситуации [82–84]. Другим важным вопросом для будущих исследований будет соотношение регуляции нервной активностью генов нейротрофиновых рецепторов и генов самих нейротрофинов, для некоторых из которых показана индукция в роли непосредственных ранних генов [85, 86].

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-801).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование было проведено в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Условия содержания животных и экспериментальные процедуры одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова.

**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](http://www.springer.com/journal/10541)), том 86, вып. 10, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways, *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 299–309, doi: 10.1038/nrn1078.
- Mitre, M., Mariga, A., and Chao, M. V. (2017) Neurotrophin signalling: Novel insights into mechanisms and pathophysiology, *Clin. Sci.*, **131**, 13–23, doi: 10.1042/CS20160044.
- Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B. L. (2010) Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges, *Dev. Neurobiol.*, **70**, 350–359, doi: 10.1002/dneu.20768.
- Friedman, W. J. (2010) Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis, *Neuroscientist*, **16**, 244–252, doi: 10.1177/1073858409349903.
- Miller, F. D., and Kaplan, D. R. (2001) Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 1045–1053, doi: 10.1007/PL00000919.
- Unsain, N., Nuñez, N., Anastasia, A., and Mascó, D. H. (2008) Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction, *Neuroscience*, **154**, 978–993, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.038.
- Kandratavicius, L., Hallak, J. E., Carlotti, C. G., Assirati, J. A., and Leite, J. P. (2014) Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with seizure type and surgical outcome, *Acta Neuropathol. Commun.*, **2**, 81, doi: 10.1186/s40478-014-0081-2.
- Conti, G., Gale, K., and Kondratyev, A. (2009) Immunohistochemical evaluation of the protein expression of nerve growth factor and its TrkA receptor in rat limbic regions following electroshock seizures, *Neurosci. Res.*, **65**, 201–209, doi: 10.1016/j.neures.2009.07.001.
- Rysenkova, K. D., Semina, E. V., Karagayur, M. N., Shmakova, A. A., Dyikanov, D. T., et al. (2018) CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation, *Oncotarget*, **9**, 29414–29430, doi: 10.18632/oncotarget.25647.
- Yepes, M. (2018) The plasminogen activation system promotes neurorepair in the ischemic brain, *Curr. Drug Targets*, **20**, 953–959, doi: 10.2174/138945012066618121144550.
- Семина Е. В., Рубина К. А., Степанова В. В., Ткачук В. А. (2016) Участие рецептора урокиназы и его эндогенных лигандов в развитии головного мозга и формировании когнитивных функций, *Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова*, **102**, 881–903.
- Шмакова А. А., Балацкий А. В., Кулебякина М. А., Шауб Т., Карагяур М. Н., и др. (2021) Гиперэкспрессия гена рецептора урокиназы uPAR в головном мозгу мыши стимулирует миграцию нейронов в кору в эмбриогенезе, *Онтогенез*, **52**, 68–79, doi: 10.31857/S0475145021010067.
- Eagleson, K. L., Bonnin, A., and Levitt, P. (2005) Region- and age-specific deficits in  $\gamma$ -aminobutyric acidergic neuron development in the telencephalon of the uPAR<sup>-/-</sup> mouse, *J. Compar. Neurol.*, **489**, 449–466, doi: 10.1002/cne.20647.
- Karagayur, M., Dyikanov, D., Makarevich, P., Semina, E., Stambolsky, D., et al. (2015) Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration, *Biomed. Pharmacother.*, **74**, 63–70, doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.002.
- Klimovich, P. S., Semina, E. V., Karagayur, M. N., Rysenkova, K. D., Sysoeva, V. Y., et al. (2020) Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin, *Biomed. Pharmacother.*, **125**, 110008, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110008.
- Karagayur, M., Rostovtseva, A., Semina, E., Klimovich, P., Balabanyan, V., et al. (2020) A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen activator stimulates peripheral nerve regeneration after injury, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **372**, 248–255, doi: 10.1124/JPET.119.261594.
- Merino, P., Diaz, A., Jeanneret, V., Wu, F., Torre, E., Cheng, L., and Yepes, M. (2017) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) binding to the uPA receptor (uPAR) promotes axonal regeneration in the central nervous system, *J. Biol. Chem.*, **292**, 2741–2753, doi: 10.1074/jbc.M116.761650.
- Semina, E., Rubina, K., Sysoeva, V., Rysenkova, K., Klimovich, P., et al. (2016) Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching, *Eur. J. Cell Biol.*, **95**, 295–310, doi: 10.1016/j.ejcb.2016.05.003.
- Rysenkova, K. D., Klimovich, P. S., Shmakova, A. A., Karagayur, M. N., Ivanova, K. A., et al. (2020) Urokinase receptor deficiency results in EGFR-mediated failure to transmit signals for cell survival and neurite formation in mouse neuroblastoma cells, *Cell. Signalling*, **75**, 109741, doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109741.

20. Klimovich, P. S., and Semina, E. V. (2020) Mechanisms of participation of the urokinase receptor in directed axonal growth, *Mol. Biol.*, **54**, 89-98, doi: 10.1134/S0026893320010094.
21. Shmakova, A. A., Rubina, K. A., Rysenkova, K. D., Gruzdeva, A. M., Ivashkina, O. I., et al. (2020) Urokinase receptor and tissue plasminogen activator as immediate early genes in pentylenetetrazole-induced seizures in the mouse brain, *Eur. J. Neurosci.*, **51**, 1559-1572, doi: 10.1111/ejn.14584.
22. Shmakova, A. A., Rubina, K. A., Anokhin, K. V., Tkachuk, V. A., and Semina, E. V. (2019) The role of plasminogen activators in the pathogenesis of epilepsy, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 979-991, doi: 10.1134/S0006297919090013.
23. Yepes, M., Sandkvist, M., Coleman, T. A., Moore, E., Wu, J.-Y., et al. (2002) Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1571-1578, doi: 10.1172/JCI14308.
24. Nodde-Ekane, X. E., and Pitkänen, A. (2013) Urokinase-type plasminogen activator receptor modulates epileptogenesis in mouse model of temporal lobe epilepsy, *Mol. Neurobiol.*, **47**, 914-937, doi: 10.1007/s12035-012-8386-2.
25. Merino, P., and Yepes, M. (2018) Urokinase-type plasminogen activator induces neurorepair in the ischemic brain, *J. Neurol. Exp. Neurosci.*, **4**, 24-29, doi: 10.17756/jnen.2018-039.
26. Yepes, M., and Lawrence, D. A. (2004) Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system, *Thromb. Haemost.*, **91**, 457-464, doi: 10.1160/TH03-12-0766.
27. Merino, P., Diaz, A., Manrique, L. G., Cheng, L., and Yepes, M. (2018) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain, *J. Biol. Chem.*, **293**, 9234-9247, doi: 10.1074/jbc.RA118.002534.
28. Mudò, G., Salin, T., Condorelli, D. F., Jiang, X. H., Dell'Albani, P., et al. (1995) Seizures increase trkC mRNA expression in the dentate gyrus of rat hippocampus, *J. Mol. Neurosci.*, **6**, 11-22, doi: 10.1007/BF02736755.
29. Mudò, G., Jiang, X. H., Timmusk, T., Bindoni, M., and Belluardo, N. (1996) Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine, *Epilepsia*, **37**, 198-207, doi: 10.1111/j.1528-1157.1996.tb00012.x.
30. Ferencz, I., Kokaia, M., Keep, M., Elmer, E., Metsis, M., et al. (1997) Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling, *Neuroscience*, **80**, 389-399, doi: 10.1016/s0306-4522(97)00006-7.
31. Sheng, F., Chen, M., Tan, Y., Xiang, C., Zhang, M., et al. (2016) Protective effects of Otophyllolide N on Pentylene-tetrazol-induced neuronal injury *in vitro* and *in vivo*, *Front. Pharmacol.*, **7**, 224, doi: 10.3389/fphar.2016.00224.
32. Ghadiri, T., Gorji, A., Vakilzadeh, G., Hajali, V., Khodaghali, F., and Sharifzadeh, M. (2020) Neuronal injury and death following focal mild brain injury: the role of network excitability and seizure, *Iranian J. Basic Med. Sci.*, **23**, 63-70, doi: 10.22038/IJBMS.2019.37558.8932.
33. Smith, A. J., Clutton, R. E., Lilley, E., Hansen, K. E. A., and Brattelid, T. (2018) PREPARE: guidelines for planning animal research and testing, *Lab. Animals*, **52**, 135-141, doi: 10.1177/0023677217724823.
34. Zhu, Y.-Y., Zhu-Ge, Z.-B., Wu, D.-C., Wang, S., Liu, L.-Y., et al. (2007) Carnosine inhibits pentylene-tetrazol-induced seizures by histaminergic mechanisms in histidine decarboxylase knock-out mice, *Neurosci. Lett.*, **416**, 211-216, doi: 10.1016/J.NEULET.2007.01.075.
35. Van Erum, J., Van Dam, D., and De Deyn, P. P. (2019) PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale, *Epilepsy Behav.*, **95**, 51-55, doi: 10.1016/j.yebeh.2019.02.029.
36. Spijker, S. (2011) Dissection of rodent brain regions, *Neuroproteomics*, **2**, 13-26, doi: 10.1007/978-1-61779-111-6\_1.
37. Franklin, K., and Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact – 3rd Edition*, Academic Press.
38. Zhang, S., Liang, F., Wang, B., Le, Y., and Wang, H. (2014) Elevated expression of pleiotrophin in pilocarpine-induced seizures of immature rats and in pentylene-tetrazole-induced hippocampal astrocytes *in vitro*, *Acta Histochem.*, **116**, 415-420, doi: 10.1016/j.acthis.2013.09.003.
39. Kalantaripour, T. P., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Najafipour, H., and Asadi-Shekaari, M. M. (2017) Apelin-13 protects rat primary cortical glia-neuron co-culture against pentylene-tetrazole-induced toxicity, *Biomed. Pharmacother.*, **87**, 661-668, doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.131.
40. Licursi, V., Conte, F., Fiscon, G., and Paci, P. (2019) MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis, *BMC Bioinformatics*, **20**, 545, doi: 10.1186/s12859-019-3105-x.
41. Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., et al. (2019) G:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update), *Nucleic Acids Res.*, **47**, W191-W198, doi: 10.1093/nar/gkz369.
42. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545-15550, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
43. Tong, Z., Cui, Q., Wang, J., and Zhou, Y. (2019) TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D253-D258, doi: 10.1093/nar/gky1023.
44. Chou, C. H., Shrestha, S., Yang, C. D., Chang, N. W., Lin, Y. L., et al. (2018) MiRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D296-D302, doi: 10.1093/nar/gkx1067.
45. Chen, Y., and Wang, X. (2020) MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D127-D131, doi: 10.1093/nar/gkz757.
46. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., and Bartel, D. P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs, *eLife*, **4**, e05005, doi: 10.7554/eLife.05005.
47. Renton, J. P., Xu, N., Clark, J. J., and Hansen, M. R. (2010) Interaction of neurotrophin signaling with Bcl-2 localized to the mitochondria and endoplasmic reticulum on spiral ganglion neuron survival and neurite growth, *J. Neurosci. Res.*, **88**, 2239-2251, doi: 10.1002/jnr.22381.
48. Wu, C. H., Hung, T. H., Chen, C. C., Ke, C. H., Lee, C. Y., et al. (2014) Post-injury treatment with 7,8-dihydroxy-flavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling, *PLoS One*, **9**, 113397, doi: 10.1371/journal.pone.0113397.
49. Almeida, R. D., Manadas, B. J., Melo, C. V., Gomes, J. R., Mendes, C. S., et al. (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways, *Cell Death Differ.*, **12**, 1329-1343, doi: 10.1038/sj.cdd.4401662.
50. Casaccia-Bonnel, P., Kong, H., and Chao, M. V. (1998) Neurotrophins: the biological paradox of survival factors

- eliciting apoptosis, *Cell Death Differ.*, **5**, 357-364, doi: 10.1038/sj.cdd.4400377.
51. Vekrellis, K., McCarthy, M. J., Watson, A., Whitfield, J., Rubin, L. L., and Ham, J. (1997) Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system, *Development*, **124**, 1239-1249.
52. Wu, C. H., Chen, C. C., Hung, T. H., Chuang, Y. C., Chao, M., et al. (2019) Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage, *J. Biomed. Sci.*, **26**, doi: 10.1186/s12929-019-0543-8.
53. Semina, E. V., Rysenkova, K. D., Troyanovskiy, K. E., Shmakova, A. A., and Rubina, K. A. (2021) MicroRNAs in cancer: from gene expression regulation to the metastatic niche reprogramming, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 785-799, doi: 10.1134/S0006297921070014.
54. Shi, J. (2014) Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers, *Acta Pharmacol. Sinica*, **36**, 149-157, doi: 10.1038/aps.2014.135.
55. Ma, S., Smith, C. M., Blasiak, A., and Gundlach, A. L. (2017) Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 1034-1048, doi: 10.1111/bph.13659.
56. Ebert, M. S., and Sharp, P. A. (2012) Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes, *Cell*, **149**, 515-524, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.005.
57. Sommerlandt, F. M. J., Brockmann, A., Rössler, W., and Spaethe, J. (2019) Immediate early genes in social insects: a tool to identify brain regions involved in complex behaviors and molecular processes underlying neuroplasticity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 637-651, doi: 10.1007/s00018-018-2948-z.
58. McNamara, J. O., Huang, Y. Z., and Leonard, A. S. (2006) Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis, *Sci. STKE*, **356**, re12, doi: 10.1126/stke.3562006re12.
59. Holm, M. M., Nieto-Gonzalez, J. L., Vardya, I., Vaegter, C. B., Nykjaer, A., and Jensen, K. (2009) Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus, *J. Neurosci.*, **29**, 12412-12418, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2978-09.2009.
60. Hilborn, M. D., Vaillancourt, R. R., and Rane, S. G. (1998) Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signaling pathway, *J. Neurosci.*, **18**, 590-600, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-02-00590.1998.
61. Oh, J. D., Chartisathian, K., Chase, T. N., and Butcher, L. L. (2000) Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain, *Brain Res.*, **853**, 174-185, doi: 10.1016/S0006-8993(99)02054-5.
62. Porcher, C., Medina, I., and Gaiarsa, J.-L. (2018) Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 273, doi: 10.3389/fncel.2018.00273.
63. Becker, A. J. (2018) Review: animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **44**, 112-129, doi: 10.1111/nan.12451.
64. Bengzon, J., Mohapel, P., Ekdahl, C. T., and Lindvall, O. (2002) Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures, *Progr. Brain Res.*, **135**, 111-119, doi: 10.1016/S0079-6123(02)35011-8.
65. Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., et al. (2010) miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 13111-13116, doi: 10.1073/pnas.1006151107.
66. Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., et al. (2008) Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *J. Alzheimer's Disease*, **14**, 27-41, doi: 10.3233/JAD-2008-14103.
67. Buckley, N. J., Johnson, R., Zuccato, C., Bithell, A., and Cattaneo, E. (2010) The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington's disease, *Neurobiol. Disease*, **39**, 28-39, doi: 10.1016/j.nbd.2010.02.003.
68. Rajgor, D. (2018) Macro roles for microRNAs in neurodegenerative diseases, *Noncoding RNA Res.*, **3**, 154-159, doi: 10.1016/j.ncrna.2018.07.001.
69. Müller, M., Jäkel, L., Bruinsma, I. B., Claassen, J. A., Kuiperij, H. B., and Verbeek, M. M. (2016) MicroRNA-29a is a candidate biomarker for Alzheimer's disease in cell-free cerebrospinal fluid, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 2894-2899, doi: 10.1007/s12035-015-9156-8.
70. Nissan, X., Blondel, S., Navarro, C., Maury, Y., Denis, C., et al. (2012) Unique preservation of neural cells in hutchinson-gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA, *Cell Rep.*, **2**, 1-9, doi: 10.1016/j.celrep.2012.05.015.
71. Jung, H. J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A. P., Davies, B. S. J., et al. (2012) Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E423-E431, doi: 10.1073/pnas.1111780109.
72. Roshan, R., Shridhar, S., Sarangdhar, M. A., Banik, A., Chawla, M., et al. (2014) Brain-specific knockdown of miR-29 results in neuronal cell death and ataxia in mice, *RNA*, **20**, 1287-1297, doi: 10.1261/rna.044008.113.
73. Ouyang, Y. B., and Giffard, R. G. (2014) MicroRNAs affect BCL-2 family proteins in the setting of cerebral ischemia, *Neurochem. Int.*, **77**, 2-8, doi: 10.1016/j.neuint.2013.12.006.
74. Xiao, P., Zhang, X., Li, Y., Ma, Z., Si, S., and Gao, X. (2019) miR-9 inhibition of neuronal apoptosis and expression levels of apoptosis genes Bcl-2 and Bax in depression model rats through Notch pathway, *Exp. Ther. Med.*, **19**, 551, doi: 10.3892/etm.2019.8228.
75. Liu, X., Wu, Y., Huang, Q., Zou, D., Qin, W., and Chen, Z. (2015) Grouping pentylentetrazol-induced epileptic rats according to memory impairment and MicroRNA expression profiles in the hippocampus, *PLoS One*, **10**, e0126123, doi: 10.1371/journal.pone.0126123.
76. Kretschmann, A., Danis, B., Andonovic, L., Abnaof, K., van Rikxoort, M., et al. (2015) Different microRNA profiles in chronic epilepsy versus acute seizure mouse models, *J. Mol. Neurosci.*, **55**, 466-479, doi: 10.1007/s12031-014-0368-6.
77. Hu, K., Zhang, C., Long, L., Long, X., Feng, L., Li, Y., and Xiao, B. (2011) Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus, *Neurosci. Lett.*, **488**, 252-257, doi: 10.1016/j.neulet.2010.11.040.
78. Schouten, M., Fratantoni, S. A., Hubens, C. J., Piersma, S. R., Pham, T. V., et al. (2015) MicroRNA-124 and -137 cooperatively controls caspase-3 activity through BCL2L13 in hippocampal neural stem cells, *Sci. Rep.*, **5**, 12448, doi: 10.1038/srep12448.
79. Okuno, H. (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers, *Neurosci. Res.*, **69**, 175-186, doi: 10.1016/j.neures.2010.12.007.
80. Fiorenza, A., Lopez-Atalaya, J. P., Rovira, V., Scandaglia, M., Geijo-Barrientos, E., and Barco, A. (2016) Blocking miRNA biogenesis in adult forebrain neurons enhances seizure susceptibility, fear memory, and food intake by increasing neuronal responsiveness, *Cerebral Cortex*, **26**, 1619-1633, doi: 10.1093/cercor/bhu332.
81. Iwakawa, H. O., and Tomari, Y. (2015) The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression,

- Trends Cell Biol.*, **25**, 651-665, doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011.
82. Bahrami, S., and Drablos, F. (2016) Gene regulation in the immediate-early response process, *Adv. Biol. Regul.*, **62**, 37-49, doi: 10.1016/j.jbior.2016.05.001.
  83. Flavell, S. W., and Greenberg, M. E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.*, **31**, 563-590, doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.
  84. Fowler, T., Sen, R., and Roy, A. L. (2011) Regulation of primary response genes, *Mol. Cell*, **44**, 348-360, doi: 10.1016/j.molcel.2011.09.014.
  85. Wang, Y., Hameed, M. Q., Rakhade, S. N., Iglesias, A. H., Muller, P. A., et al. (2014) Hippocampal immediate early gene transcription in the rat fluid percussion traumatic brain injury model, *NeuroReport*, **25**, 954-959, doi: 10.1097/WNR.0000000000000219.
  86. Lauterborn, J. C., Rivera, S., Stinis, C. T., Hayes, V. Y., Isackson, P. J., and Gall, C. M. (1996) Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters, *J. Neurosci.*, **16**, 7428-7436, doi: 10.1523/jneurosci.16-23-07428.1996.

## EARLY INDUCTION OF NEUROTROPHIN RECEPTOR AND miRNA GENES IN MOUSE BRAIN AFTER PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED NERVOUS ACTIVITY

A. A. Shmakova<sup>1,2</sup>, K. D. Rysenkova<sup>1,2</sup>, O. I. Ivashkina<sup>3,4,5</sup>, A. M. Gruzdeva<sup>3</sup>, P. S. Klimovich<sup>1,2</sup>,  
V. S. Popov<sup>1</sup>, K. A. Rubina<sup>1</sup>, K. V. Anokhin<sup>3,4</sup>, V. A. Tkachuk<sup>1,2</sup>, and E. V. Semina<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119192 Moscow, Russia; E-mail: e-semina@yandex.ru

<sup>2</sup> Institute of Experimental Cardiology, National Cardiology Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, 119192 Moscow, Russian Federation; E-mail: k.anokhin@gmail.com

<sup>4</sup> Anokhin Research Institute of Normal Physiology, 125315 Moscow, Russian Federation

<sup>5</sup> National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

Neurotrophin receptors regulate neuronal survival, neural network formation, and synaptic plasticity in the brain via interaction with their ligands. In the present study we analyzed early changes in the expression of neurotrophin receptor genes *Ntrk1* (TrkA), *Ntrk2* (TrkB), *Ntrk3* (TrkC), *Ngfr* (p75NTR) and miRNAs that target them in mouse brain after the induction of seizure neural activity by pentylenetetrazole injection. The obtained results indicate that the expression of *Ntrk3* and *Ngfr* is increased in the cortex and hippocampus 1-3 hours after seizures; *Ntrk2* expression is increased in the anterior cortex after 3-6 hours, and after 1 hour and 6 hours in the hippocampus. At the same time, in the anterior and posterior cortex, but not in the hippocampus, the ratio of signaling proteins Bcl-2 / Bax increases, reflecting the activation of anti-apoptotic signaling. We also detect the increase in the expression of miRNA-9 and miRNA-29a, which are predicted to target *Ntrk3*, in the hippocampus 3 hours after pentylenetetrazole injection. Thus, it can be concluded that early cellular response to seizure neural activity in the brain includes the induction of *Ntrk2*, *Ntrk3*, *Ngfr*, miRNA-9 and miRNA-29a expression, as well as the activation of signaling pathways that involve Bcl-2 and Bax proteins, which may characterize them as important mediators in the regulation of neuronal adaptation and survival upon the induction of generalized neural activity.

**Keywords:** neurotrophin receptors TrkA, TrkB, TrkC, p75NTR, miRNAs, miRNA-9, miRNA-29a, early response genes, neuronal activation, apoptosis

УДК 57.05;57.021:612.66;612.67;57.022

## ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ПИТАНИЯ НА СТАРЕНИЕ: ИСПРАВЛЕНИЕ ПРОБЛЕМ С «СЕНСОРАМИ ПИТАНИЯ» У ПОСТМИТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК?

### Обзор

© 2021 Г.В. Моргунова\*, Г.А. Шиловский, А.Н. Хохлов

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119234 Москва, Россия; электронная почта: morgunova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 12.07.2021

После доработки 25.07.2021

Принята к публикации 26.07.2021

В обзоре рассматривается вопрос о роли нарушений метаболизма (в частности, инсулинорезистентности) в формировании возрастных болезней и в «нормальном» старении с акцентом на изменения в постмитотических клетках высших организмов. Ограничение калорийности питания помогает бороться с такими метаболическими нарушениями, с чем, вероятно, и связана его способность продлевать жизнь лабораторным животным. Поддержание метаболического гомеостаза особенно важно для высокодифференцированных долгоживущих клеток организма, продолжительность жизни которых сопоставима с продолжительностью жизни организма. Нормальное функционирование этих клеток можно обеспечить лишь при условии адекватно работающей системы очистки их цитоплазмы, а также обеспечения этих клеток всеми необходимыми питательными веществами и энергией. Одной из центральных проблем в геронтологии является нарушение с возрастом метаболизма глюкозы, ведущее к соответствующим патологиям — ожирению, диабету, метаболическому синдрому и др. Скелетная мускулатура наряду с жировой тканью является основным потребителем инсулина, поэтому физическая активность мышц, поддерживающая их энергетический метаболизм, позволяет отсрочить возникновение инсулинорезистентности. Развившись, она нарушает, в частности, метаболизм кардиомиоцитов, которые оказываются в среде, богатой питательными веществами, но не могут использовать их для выполнения своих функций. Это способствует возникновению сердечно-сосудистых возрастных болезней. Метаболические патологии также изменяют чувствительность к питательным веществам нейронов, вследствие чего нарушается действие инсулина в центральной нервной системе. Кроме того, есть основания полагать, что в нейронах также может развиваться инсулинорезистентность. Предполагается, что воздействия на сенсоры питания (например, АМРК) в постмитотических клетках могут положительно влиять на многоклеточный организм, замедляя его старение и увеличивая продолжительность жизни.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ограничение калорийности питания, метаболизм, АМРК, аутофагия, кардиомиоциты, миоциты, нейроны.

DOI: 10.31857/S0320972521100092

### ВВЕДЕНИЕ

Возрастная деградация так или иначе связана с метаболическими нарушениями и сбоями систем регуляции обмена веществ на всех уровнях организации — от клеток до регулирующих систем многоклеточного организма. В частности, развивающееся с возрастом нарушение толе-

рантности к глюкозе приводит к развитию метаболического синдрома. Ограничение калорийности питания помогает бороться с метаболическими нарушениями, с чем, вероятно, и связана его способность продлевать жизнь лабораторным животным [1–5]. Основными участниками сигнальных путей, чувствительных к колебаниям концентрации питательных веществ,

Принятые сокращения: ИР — инсулинорезистентность; ИРец — инсулиновый рецептор; СДII — сахарный диабет второго типа; СЖК — свободные жирные кислоты; ЦНС — центральная нервная система; АМРК — 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа, 5'-AMP-activated protein kinase; AS160 — субстрат Akt массой 160 кДа, Akt substrate of 160 kDa; DAG — диацилглицерин, diacylglycerol; GLUT — переносчик глюкозы, glucose transporter; IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor 1); IRS — субстраты инсулинового рецептора (insulin receptor substrate); mTOR — mechanistic target of rapamycin; mTORC1 — механистическая мишень рапамицина — комплекс 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1); p70S6K — рибосомная p70S6-киназа (70 kDa ribosomal protein S6 kinase); PI3K — фосфоинозитол-3-киназа (phosphoinositide 3-kinase); PKB — протеинкиназа B; PKC — протеинкиназа C; TOR — target of rapamycin.

\* Адресат для корреспонденции.

являются инсулин, TOR (target of rapamycin), 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК, 5'-AMP-activated protein kinase). Метаболические сбои начинаются на уровне этих сигнальных путей. Так, ухудшение функционирования АМРК приводит ко множественным расстройствам регуляции — например, к развитию инсулинорезистентности (ИР) [6]. Активация или подавление некоторых метаболических сенсоров помогают продлевать жизнь самым разным организмам и улучшать возрастные показатели у людей.

Одним из следствий поломок метаболизма является развитие нарушений в протеолизе и энергетическом обмене клеток. Высокодифференцированные клетки в значительной мере страдают из-за таких нарушений. Продолжительность жизни нейронов и миоцитов довольно велика и сопоставима с продолжительностью жизни организма, нормальное функционирование этих клеток можно обеспечить лишь при условии адекватно работающей системы очистки их цитоплазмы и обеспечения этих клеток всеми необходимыми питательными веществами и энергией. Поломки в системе протеолиза и аутофагии, а также нарушение регуливающей роли АМРК в конечном счёте приводят к деградации и гибели постмитотических клеток. У таких клеток есть свои способы борьбы с развитием различных развивающихся при старении дефектов — например, мышечные волокна первого типа могут использовать для снижения производства активных форм кислорода «мягкое» разобщение [7]. При частичном разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования происходит некоторое снижение производства АТФ, но в гораздо большей степени снижается количество образующихся активных форм кислорода. По-видимому, «мягкое» разобщение по своему действию сходно с ограничением калорийности питания, так как в обоих случаях отмечается уменьшение количества АТФ в организме [8]. При ограничении питания меньше АТФ образуется из-за недостатка калорий, а при «мягком» разобщении — из-за того, что часть протонов проходит через мембрану митохондрий вхолостую, а не используется АТФ-синтазой для производства АТФ.

Развитие дисбаланса в системе регуляции метаболизма, вероятно, является побочным продуктом процесса развития организма и возникает закономерно. Завершение развития опорно-двигательной и нервной системы у человека происходит к 21–23 годам. После некоторого периода оптимальной работы этих систем наблюдается уменьшение количества мышечных волокон и нейронов, сначала почти не-

заметное, но постепенно набирающее скорость. Уменьшение числа потребляемых калорий или физическая нагрузка, которая помогает расходовать лишние калории, могут нормализовать показатели нервной и сердечно-сосудистой систем, ухудшающиеся с возрастом.

Все указанные сигнальные пути являются высококонсервативными, а потому могут изучаться на самых разных объектах. Для моделирования старения постмитотических клеток широко используется модель хронологического старения дрожжей и реже — модель «стационарного» старения бактерий и клеток млекопитающих («возрастная» деградация клеток при ограничении их пролиферации и дальнейшем пребывании в стационарной фазе роста) [9–14]. Известно, что активация аутофагии и АМРК (у дрожжей — SNF1, от *sucrose-nonfermenting*) или ингибирование TOR также помогают продлевать жизнь клеткам в культуре, что подтверждает адекватность использования таких моделей [15–17].

Несмотря на большое количество работ, посвящённых теме ограничения калорийности питания, многие вопросы всё ещё остаются в рамках дискуссии. Могут ли в борьбе со старением полностью заменить ограничение калорийности питания его миметики? Какие могут быть последствия у избыточной активации сигнальных путей, положительно влияющих на жизнеспособность? Как продлить жизнь активно функционирующим «стареющим» высококодифференцированным клеткам, которые обязательно должны потреблять большое количество энергии? На эти и многие другие вопросы у исследователей ещё нет однозначных ответов. Хотя бы на некоторые из них мы постарались ответить в настоящем обзоре.

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ

В клетке существует сложная метаболическая сеть, которая обеспечивает получение энергии и строительных элементов из источников, поступающих из окружающей среды или кровотока. Основными такими источниками являются глюкоза, глутамин и жирные кислоты. Спектр метаболических сенсоров довольно широк, среди них даже такие неочевидные, как сенсоры внеклеточных нуклеотидов и сенсоры на основе РНК [18].

Метаболизму глюкозы и связанным с нарушениями в системе восприятия глюкозы процессами (ИР, ожирением, диабетом и метаболическим синдромом) посвящены многочисленные геронтологические исследования. Роль

глюкозы в жизнедеятельности клетки и организма сложно переоценить. Глюкоза — не только необходимый источник энергии, но и важный стимулятор клеточной пролиферации. У человека формирование метаболических путей, регулирующих энергетическое обеспечение, а также созревание соответствующих нервных структур происходят на поздних сроках беременности [19]. Этот процесс необходим для перехода плода от питания через плаценту к самостоятельному эндогенному производству глюкозы. В связи с этим сильно недоношенные дети испытывают нехватку энергии, которая приводит к снижению уровня инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1, insulin-like growth factor 1) и нарушению метаболизма глюкозы [20]. Низкий уровень IGF-1 становится одной из основных причин недоразвития многих систем/органов и в первую очередь — центральной нервной системы (ЦНС). Кроме того, голодание матери или нарушения в передаче питательных веществ через плаценту на внутриутробном этапе могут наложить отпечаток на всю последующую жизнь и даже определить её продолжительность [21–26]. Избыточное питание матери также приводит к нарушению метаболизма глюкозы и влияет на развитие ЦНС и других структур у плода [27]. При ИР у матери с гестационным диабетом материнский инсулин не проникает через плаценту, но глюкоза транспортируется, вследствие чего плод подвергается воздействию гипергликемии и реагирует на повышенный уровень глюкозы повышенным выделением инсулина [28]. Можно полагать, что глюкоза является одним из важных метаболических факторов, определяющих развитие организма.

Когда глюкоза поступает в организм, происходит секреция инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы. Инсулин стимулирует поглощение клетками глюкозы, аминокислот и других веществ, увеличивает интенсивность синтеза гликогена и жирных кислот, активирует гликолиз, подавляет глюконеогенез, липолиз и гидролиз белков. Таким образом, все эффекты инсулина настроены на усиление анаболизма и торможение катаболизма. У наиболее активно изучаемых в геронтологии модельных объектов, таких как дрозофила, нематода и дрожжи, нет инсулина, но есть IGF-1. Сигнальные пути инсулина/IGF-1 эволюционно консервативны и ответственны за рост и развитие. Инсулин в организме человека также частично влияет на митохондриальные процессы, но мы будем рассматривать преимущественно его метаболическое влияние, а потому почти не будем касаться IGF-1 и пути инсулина/IGF-1.

Важную роль в регуляции метаболизма играют AMPK и TOR, в том числе и у организмов, у которых нет инсулина. AMPK активируется, когда повышается отношение АМФ/АТФ (отсюда и название «АМФ-активируемая»), и является, таким образом, основным сенсором недостатка энергии [29]. Основная задача AMPK — отключить анаболические процессы и запустить катаболические. Её регуляторная роль затрагивает работу всех органов и тканей, вызывая остановку липогенеза, глюконеогенеза, синтеза холестерина, триглицеридов, жирных кислот, белков и гликогена, а также активируя потребление глюкозы и жирных кислот с их последующим окислением. AMPK является серин/треониновой протеинкиназой и представляет собой гетеротример, состоящий из трёх субъединиц, каждая из которых имеет несколько изоформ. Существуют две изоформы каталитической альфа-субъединицы ( $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ ), две изоформы регуляторной бета-субъединицы ( $\beta 1$  и  $\beta 2$ ) и три изоформы регуляторной гамма-субъединицы ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  и  $\gamma 3$ ). Подробно структура и многочисленные функции AMPK описаны в большом числе обзорных работ [29–31]. Действие AMPK во многом противоположно действию комплекса mTOR (mechanistic target of rapamycin). mTOR активируется, когда энергии много (есть глюкоза), и запускает анаболические процессы. Как и AMPK, mTOR является серин/треониновой протеинкиназой из семейства киназ, родственных PI3K (phosphoinositide 3-kinase, фосфоинозитол-3-киназа), и регулирует большое количество ключевых метаболических мишеней в клетке. mTOR входит в состав двух белковых комплексов — mTORC1 (состоит из белков mTOR, Raptor и mLST8; очень чувствителен к рапамицину) и mTORC2 (состоит из белков mTOR, Rictor, Sin1 и mLst8). Оба комплекса управляют ростом и выживанием клеток, но только первый регулирует метаболические реакции [32]. mTORC1 как раз и является центральным узлом, который координирует рост клеток с доступностью питательных веществ, энергии и факторов роста [33]. Передача сигналов mTOR вовлечена в процесс старения у различных организмов и хорошо изучена на модельных геронтологических объектах (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, грызуны); ингибитор mTOR, рапамицин, продлевает продолжительность их жизни [15, 34–36]. В то же время возникающая с возрастом избыточная активация пути mTORC, вероятно, становится причиной старения, а также усугубляет течение онкологических заболеваний и диабета [37]. Положительное влияние ограничения калорийности питания связывают с активаци-

ей AMPK и со снижением активности пути mTORC1.

**Инсулинорезистентность.** ИР — это снижение тканевого ответа на стимуляцию инсулином. Она характеризуется нарушением поглощения и окисления глюкозы, снижением синтеза гликогена и, в меньшей степени, способностью подавлять окисление липидов [38].

Хотя в развитии ИР принимает участие сразу несколько органов и тканей, мы хотим в большей мере сконцентрироваться на нейронах, кардиомиоцитах и миоцитах скелетной мускулатуры, клетки которых с некоторыми оговорками существуют столько же, сколько и сам организм (за исключением таких ситуаций, как появление новых нервных клеток в гиппокампе и обонятельном мозге или отмирание миоцитов при саркопении). При этом важно отметить, что роль нервной и мышечной ткани в метаболизме глюкозы разная.

Инсулин является пептидным гормоном, вырабатываемым  $\beta$ -клетками поджелудочной железы. Он воздействует на рецепторы, связанные с плазматической мембраной в клетках-мишенях, чтобы управлять комплексным анаболическим ответом на поступление питательных веществ [39]. Инсулин синтезируется при увеличении уровня глюкозы в циркулирующей крови, однако его синтез и высвобождение в кровь могут происходить и при изменении уровня аминокислот, ацетилхолина, холецистокинина и др. [40]. Как анаболический гормон, инсулин способствует накоплению энергии (усвоению глюкозы, аминокислот и жирных кислот), росту клеток и подавляет катаболические процессы — гликолиз, липолиз, протеолиз. Он оказывает на ткани-мишени как прямое, так и косвенное воздействие. Косвенные эффекты инсулина трудно моделировать, так как они в значительной степени переплетаются с другими эффектами и зависят от многих факторов. Изучены они хуже, чем клеточно-автономные проявления действия гормона, которые можно моделировать на клеточных культурах [39].

Упрощённая схема метаболического действия инсулина представлена на рисунке. Инсулиновый рецептор (ИРец) состоит из двух внеклеточных альфа-субъединиц и двух внутриклеточных бета-субъединиц. ИРец за счёт своей тирозинкиназной активности фосфорилирует остатки тирозина на адаптерных белках из семейства субстратов ИРец (IRS, insulin receptor substrate) и активирует PI3K. Из шести членов семейства IRS, идентифицированных на сегодняшний день, IRS-1 и IRS-2 ответственны за большинство многочисленных эффектов инсулина, связанных с активацией двух основных

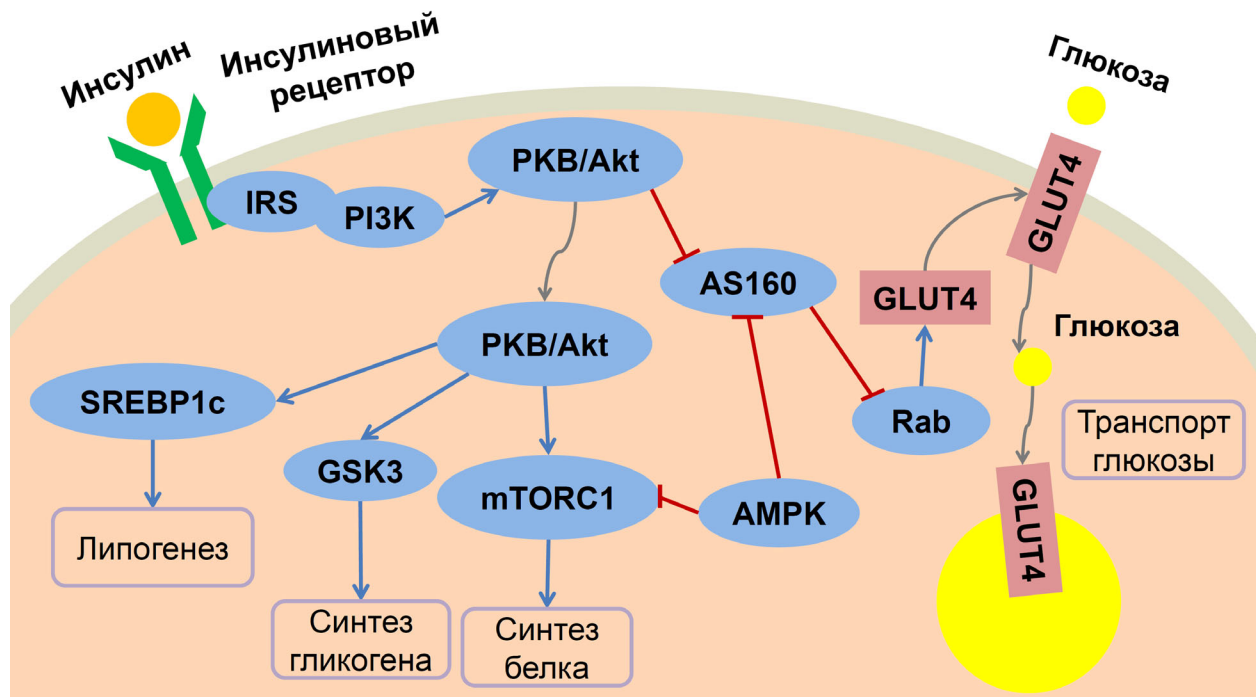
сигнальных путей — PI3K—PKB/Akt (PKB/Akt — protein kinase B, протеинкиназа B) и Ras—MAPK (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа) [28]. IRS-1 особенно важен в скелетных мышцах, жировой ткани и коре головного мозга, IRS-2 — в печени и гипоталамусе. Активированный IRS стимулирует передачу сигналов через путь PI3K—PKB/Akt. PKB/Akt регулирует фосфорилирование многих внутриклеточных белков, в том числе mTORC1, GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$ ), SREBP1c (белок, связывающий регуляторный элемент стерола 1c; sterol regulatory element-binding protein 1c); через фосфорилирование AS160 (субстрат Akt массой 160 кДа, или TBC1D4 — член четвёртого семейства доменов TBC1, TBC1 domain family member 4) она стимулирует перемещение переносчиков глюкозы в мембрану [39–42]. IGF-1 также может связывать и активировать рецепторы инсулина, а рецепторы как инсулина, так и IGF могут инициировать сходные трофические процессы [40].

В настоящее время доминирует гипотеза о том, что причиной типичной ИР, связанной с ожирением, являются дефекты передачи инсулинового сигнала, а не снижение связывания с ИРец. Однако в действительности и пониженное содержание поверхностного ИРец, и нарушение передачи инсулинового сигнала вносят вклад в типичную ИР, связанную с ожирением [39]. Контроль уровня глюкозы в крови в значительной степени зависит от баланса между инсулином и противоположными по действию гормонами, которые связываются с соответствующими рецепторами в мышечной и жировой ткани, а также в печени.

ИР способствует не только гипергликемии, но также гиперлипидемии [40]. Так как каждая из этих тем заслуживает отдельного обзора, в данной работе мы преимущественно сконцентрировались на нарушении метаболизма глюкозы и развитии ИР (которые, в свою очередь, способствуют нарушению жирового и белкового обмена) и лишь коротко — на других видах метаболических нарушений.

## ВОЗРАСТНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В МИОЦИТАХ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ

Скелетная мускулатура наряду с жировой тканью играет крайне важную роль во многих метаболических процессах, в том числе в регулировании уровня глюкозы в крови, определении скорости метаболизма в покое, поддержа-



Сигнальные пути инсулина. Метаболическая ветвь передачи сигнала инсулина осуществляется через активацию IRS (субстратов инсулинового рецептора). После связывания со своим рецептором инсулин активирует IRS, а они, в свою очередь, стимулируют активацию пути PI3K–PKB/Akt. Быстрые эффекты включают активацию синтеза гликогена и белка, медленные эффекты – стимуляцию липогенеза. Стимуляция поглощения глюкозы инсулином происходит за счёт перемещения содержащих GLUT4 запасных везикул к плазматической мембране. В случае активации AMPK тормозит синтез белка и активирует транспорт глюкозы. Синие стрелки – активация, красные линии – ингибирование, серые стрелки – перемещение. AMPK – 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа; AS160 – субстрат Akt массой 160 кДа; GLUT4 – переносчик глюкозы 4; GSK3β – киназа гликогенсинтазы 3β; IRS – субстраты инсулинового рецептора; mTORC1 – механистическая мишень рапамицина – комплекс 1; PI3K – фосфоинозитол-3-киназа; PKB – протеинкиназа B; Rab – ГТФ-связывающий белок; SREBP1c – белок, связывающий регуляторный элемент стерола 1c

нии внутренней температуры тела и т.д. [43]. Мышцы составляют 40% от массы тела [44] и обеспечивают опосредованное поглощение 60–70% инсулина, производимого организмом [45], поэтому неудивительно, что развитие возрастных метаболических патологий во многом связано с этой тканью. При появлении глюкозы в крови инсулин стимулирует синтез гликогена в мышцах. Перенос глюкозы как в мышечных, так и в жировых клетках осуществляется с помощью GLUT4 [45]. GLUT4 зависит от инсулина и начинает работать только тогда, когда глюкозы достаточно, чтобы можно было начать производство запасных метаболитов.

**Инсулинорезистентность в скелетных мышечных клетках.** ИР в скелетных мышцах характеризуется сниженным инсулин-стимулированным захватом глюкозы из-за ухудшения передачи сигналов инсулина и подавления транслокации GLUT4. ИР скелетных миоцитов способствует повышению постпрандиальных уровней глюкозы и снижению толерантности к ней, так как скелетная мускулатура ответственна за по-

глощение большей части глюкозы после приёма пищи [46].

Как гормон хранения энергии, инсулин стимулирует в миоцитах в первую очередь синтез гликогена и, в меньшей степени, – гликолиз [39]. Нарушение способности клеток скелетных мышц поглощать под воздействием инсулина глюкозу является основным компонентом типичной ИР, связанной с ожирением и сахарным диабетом второго типа (СДII). Индуцированный инсулином синтез мышечного гликогена почти на 50% нарушен у пациентов с СДII и у худых здоровых инсулинорезистентных потомков пациентов с СДII [39]. ИР в скелетных мышцах связана с дефектами на самых проксимальных уровнях передачи сигналов инсулина – ИРец, IRS-1, PI3K и PKB/Akt. При ИР мышечных клеток одновременно обнаруживаются также дистальные дефекты, но всё ещё не вполне понятно, имеют ли такие дефекты независимое происхождение или являются просто вторичными по отношению к проксимальным дефектам [39]. Известно, что в патогенез ИР в печени

и скелетных мышцах вовлечены также некоторые липидные фрагменты — диацилглицерин (DAG, diacylglycerol), церамиды, ацилкарнитины [47, 48].

**Проксимальные дефекты.** В скелетных мышцах экспрессируются и IRS-1, и IRS-2. Однако на первичных мышечных трубках человека [49] и на мышечных трубках L6-крыс [50] было показано, что нокдаун только *IRS-1* приводит к нарушению инсулин-стимулированного транспорта глюкозы. В скелетных мышцах экспрессируются обе основные изоформы каталитической субъединицы PI3K и обе формы Akt. Так как РНК-интерференция *Akt2* в первичных мышечных трубках человека отменяет стимулированные инсулином захват глюкозы и синтез гликогена, а нокдаун *Akt1* не влияет на эти параметры [49], можно предположить, что Akt2 более важна для стимулированного инсулином метаболизма глюкозы. Важность Akt2 для нормального действия инсулина подчёркивается идентификацией мутации частичной потери функции в *Akt2* (p.Pro50Thr), которая за редкими исключениями встречается только у финского населения: частота 1,1% у финнов против 0,02% у европейцев-нефиннов. Мутация нарушает стимулированное инсулином поглощение глюкозы в мышечной и жировой ткани, увеличивает выработку эндогенной глюкозы и повышает, таким образом, риск развития СДII [51]. Ещё в 90-х гг. прошлого века с помощью магнитно-резонансной спектроскопии с использованием изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$  было неоднократно показано, что транспорт глюкозы ответственен за снижение индуцированного инсулином синтеза гликогена в мышцах у пациентов с диабетом [39]. Таким образом, дефекты затрагивают связывание инсулина с ИРец и транслокацию GLUT4. Важно отметить, что в скелетных мышцах людей с ожирением или СДII не развивается ИР к передаче митогенных сигналов через MAPK [52].

Надо отметить, что печень и мышцы поглощают циркулирующие свободные жирные кислоты плазмы, из-за чего происходит эктопическое накопление липидов, которое также способствует развитию ИР в печени и мышцах [53].

В развитии ИР могут играть важную роль циркадные ритмы (и центральные, и периферические), так как они координируют метаболизм глюкозы [46]. В частности, периферические часы в мышцах, жировой ткани и печени регулируют их чувствительность к инсулину. Так как эти периферические часы не получают информацию о прямом освещении, они чувствительны к другим синхронизаторам — например, к метаболическим сигналам, связанным с приёмом

пищи [54, 55]. Молекулярные часы скелетных мышц синхронизируются физической активностью [56, 57]. Метаболическое здоровье является оптимальным, когда различные суточные ритмы (включая поведенческие ритмы голодания-питания и сна-бодрствования), ритмы гормональной системы и вегетативной нервной системы, а также ритмы центральных и периферических часов колеблются синхронно друг с другом. Напротив, несоответствие между некоторыми компонентами этой системы — например, между поведенческими и тканевыми ритмами часов — может привести к нарушению циркадных ритмов и развитию ИР и СДII [46]. Однако ещё не вполне понятно, нарушение каких именно часов, центральных или периферических, вызывает ИР на тканевом уровне. Кроме того, могут быть задействованы оба механизма.

**Пролиферация в скелетной мускулатуре и связанная с возрастом потеря миоцитов.** Миоциты скелетных мышц срастаются в многоядерное мышечное волокно и уже не могут делиться. У взрослого человека может пролиферировать лишь небольшая популяция мышечных сателлитных клеток. Обычно покоящиеся сателлитные клетки при повреждении мышцы активируются, после этого они делятся, дифференцируются и превращаются в новые миоцеллы, которые сливаются с уже существующими волокнами [58]. Важную роль в обеспечении жизнеспособности покоящихся сателлитных клеток и их подготовке к выходу из состояния покоя играет аутофагия [59]. Только при условии, что механизм аутофагии не нарушен, возможна пролиферация в мышцах.

Более высокая мышечная масса (относительно массы тела) связана с лучшей чувствительностью к инсулину и меньшим риском развития преддиабета или явного СДII [60]. Многочисленные исследования показывают, что у лиц, склонных к СДII, отсрочить развитие заболевания можно за счёт физической нагрузки [61–65], а у людей с уже развившимся диабетом с помощью физических тренировок удаётся улучшить ряд показателей, включая чувствительность к инсулину [66–68]. Существует обратная связь между силой мышц и смертностью от всех причин [69]. Также известно, что смертность от всех причин снижают силовые тренировки [70]. Мышечная масса и сила являются важными защитными факторами против развития одного из самых тяжёлых последствий ИР — метаболического синдрома [71–73]. Вместе с тем развитие атрофии и саркопении, напротив, способствует развитию ИР. Саркопения, не зависящая от ожирения, связана с нарушением

метаболизма глюкозы (важно, что особенно сильна эта связь у людей в возрасте до 60 лет). Это позволяет предположить, что низкая мышечная масса может быть ранним предиктором предрасположенности к диабету [74]. У человека период пиковой активности опорно-двигательной системы приходится на 20–30 лет, после этого мышцы начинают терять волокна [75], но это не так сильно отражается на их абсолютной силе до 60 лет [43]. Пожилым людям свойственна старческая саркопения, которая характеризуется как снижением числа мышечных волокон (и типа I, и типа II), так и уменьшением их размера и особенно – атрофией волокон второго типа [76, 77]. С возрастом уменьшается не только количество, но и качество волокон. Так, в лонгитудинальном исследовании на выборке, состоящей из людей 70–79 лет, было показано, что возрастное снижение силы мышц в этой возрастной группе может быть в несколько раз больше, чем снижение их массы [78].

Развитие ИР в мышцах, вероятно, также связано с нарушением работы АМПК. Базальная активность этой киназы в мышцах старых крыс ниже, чем в мышцах молодых [79]. Хотя в тканях пожилых людей повышено отношение АМФ/АТФ, чувствительность АМПК с возрастом ухудшается [80]. АМПК активируется в миоцитах при физической нагрузке. Низкомолекулярные активаторы АМПК вызывают усиленное поглощение глюкозы и окисление жирных кислот как *in vitro*, так и на животных моделях [6, 81]. Важно отметить, что прямая фармакологическая активация АМПК в печени не может вызвать резкое снижение уровня глюкозы в плазме, в то время как прямая её активация в мышцах способствует усилению утилизации глюкозы. Это делает АМПК перспективной мишенью для поиска антидиабетических препаратов [6].

Передача сигналов mTORC1 (но не mTORC2 [82, 83]) очень важна для стимуляции роста мышц. При этом краткосрочная активация приводит к развитию мышечной гипертрофии [84], а долгосрочная, напротив, способствует атрофии из-за того, что такая активация подавляет аутофагию [85]. Таким образом, для оптимального функционирования мышц необходимо чередование периодов высокой и низкой активности mTORC1 (и, вероятно, АМПК), как это происходит при нормальном цикле питания-голодания [37].

Наконец, существует некоторое противоречие между тем, что мы получаем в экспериментах на модельных животных объектах, и тем, что видим в результатах эпидемиологических и клинических исследований. Если у лабораторных животных продление жизни часто вызыва-

ется за счёт подавления путей, активирующих митогенные эффекты (это приводит к уменьшению вероятности развития рака), то в клинических исследованиях мы видим, что качество и продолжительность жизни людей зависят от активности мышц и их массы, что не совместимо с подавлением митогенных эффектов и сокращением потребления количества калорий. Внимание этой проблеме уделили в своём обзоре McLeod et al. [76]. Рапамицин тормозит анаболические процессы в мышцах молодых здоровых людей [86, 87]. Следовательно, он будет препятствовать сохранению здоровой мышечной массы. Таким образом, данные, которые мы получаем в экспериментах на животных, подвергнутых воздействию ингибиторов анаболизма, не позволяют говорить о высоком *качестве* их жизни. К тому же есть основания полагать, что все существующие антимитогенные эффекты способствуют ослаблению особей. В то же время снизить вероятность развития рака у человека можно с помощью аэробных и силовых физических нагрузок [88, 89]. Проверку влияния тренировок можно также проводить и на животных, как, например, в исследовании датских учёных, установивших, что у старых мышей произвольный бег в колесе с высоким сопротивлением способствует сохранению мышечной массы на уровне, характерном для мышцей среднего возраста, при этом волокна в мышцах по составу становятся более «окислительными» [90]. Животные модели должны быть подобраны так, чтобы в них можно было изучать влияние развития скелетных мышц на продолжительность жизни. Хорошим примером могут служить работы И.А. Аршавского, в которых путём целого ряда последовательных воздействий достигалась высокая степень развития скелетных мышц у кроликов и других лабораторных животных, что способствовало увеличению продолжительности и *качества* их жизни [91, 92]. По-видимому, с учётом нынешних знаний о возрастных метаболических нарушениях требуется проводить больше исследований такого рода.

Так как скелетная мускулатура является одним из важных потребителей значительной части поступающей в организм энергии, её активность (действующая так же, как ограничение калорийности питания) является необходимым условием для увеличения продолжительности жизни. Недостаточная же физическая активность приводит к накоплению избытка питательных веществ в организме, неизбежно превращающегося в жир. Во избежание накопления избыточного веса наряду с потреблением энергии необходим её постоянный расход.

К сожалению, разобраться в возрастных метаболических нарушениях не так просто из-за сложных причинно-следственных связей, но нам кажется, что более перспективным будет углубление в изучение «антивозрастного» влияния физических нагрузок, а не миметиков ограничения калорийности питания.

**Другие метаболические нарушения в скелетных мышцах.** Необходимо отметить, что саркопения характеризуется нарушением протеолиза и, как следствие, aberrантным обменом белков, ухудшением функций митохондрий, воспалениями, нервно-мышечной дегенерацией и т.д. Кроме ИР существуют и другие метаболические нарушения, которые приводят к развитию таких последствий. Например, было показано, что необходимый для стимулирования мышечных стволовых клеток и восстановления повреждённых мышц простагландин E2 расщепляется под воздействием 15-гидроксипростагландиндегидрогеназы в скелетных мышцах старых мышей. Избыточная экспрессия этого фермента у молодых мышей вызывает потерю мышечной массы, а кратковременное его ингибирование у старых мышей предотвращает истощение мышц [93].

Кроме метаболизма глюкозы для скелетных мышц также важен и обмен аминокислот. Заменимые аминокислоты не стимулируют синтез мышечного белка [94], поэтому среди аминокислот, оказывающих особое влияние на мышцы, в первую очередь важны незаменимые, особенно — лейцин. Он является одним из самых главных стимулирующих факторов для активации пути mTORC1 — инициатора трансляции белка [94, 95]. Он активирует синтез мышечного белка инсулинзависимым и инсулиннезависимым способом [96]. С возрастом мышцы становятся менее чувствительными к анаболическим свойствам аминокислот [97], у пожилых людей развивается так называемая анаболическая резистентность к синтезу мышечного белка [98]. В связи с этим для достижения положительного эффекта тренировок пожилым людям необходимо принимать не только белковую пищу, но и дополнительное количество лейцина [94, 95, 97].

**Метаболические нарушения в кардиомиоцитах.** Сердце млекопитающих должно сокращаться непрерывно, поэтому оно нуждается в большом количестве энергии [99]. Кардиомиоциты являются клетками с самым высоким содержанием митохондрий (они занимают одну треть объёма клетки) [100]. В сердце человека за один день перерабатывается количество АТФ, которое в 15–20 раз превышает его собственный вес [99].

Хотя сердце представляет собой лишь второстепенное место утилизации глюкозы в орга-

низме, оно тем не менее является инсулин-чувствительным органом [101]. При нормальной рабочей нагрузке этот орган вырабатывает энергию в основном за счёт окисления жирных кислот, а точнее — свободных жирных кислот (СЖК); в меньшей степени — за счёт гликолиза, а также окисления пирувата и других субстратов, что изначально было показано на перфузируемых препаратах сердца крысы при аэробной перфузии [102]. В сердце взрослого человека СЖК также являются преобладающим субстратом для производства АТФ (50–70% необходимого организму количества), но возможно использование и других субстратов — глюкозы и лактата (25–30%), аминокислот и кетонных тел [38]. Интересно, что до 40% глюкоза-опосредованного производства АТФ в сердце обеспечивается за счёт гликогена [103]. СЖК нарушают опосредованное инсулином потребление глюкозы, ингибируют гликолиз и окисление пирувата, поэтому их высокий уровень тормозит передачу сигнала инсулина [101]. В кардиомиоцитах основным переносчиком глюкозы, как и в миоцитах скелетной мускулатуры, является GLUT4 [104], существует также базальное поглощение глюкозы сердцем через GLUT1, но оно второстепенно [38]. Инсулин через PI3K и AMPK [101] стимулирует транслокацию GLUT4 в сарколемме кардиомиоцитов и одновременно ингибирует высвобождение СЖК из жировой ткани. Таким образом, уровень потребления глюкозы тесно связан с концентрацией циркулирующих в крови СЖК. Специфическая диабетическая кардиомиопатия развивается на основе дисбаланса между окислением липидов и окислением глюкозы. Этим объясняется и тот факт, что довольно часто диабетическая дислипидемия опережает СДII на несколько лет, т.е. нарушение липидного обмена является ранним событием в развитии сердечно-сосудистых заболеваний при таком типе диабета [105]. В связи с этим наиболее перспективным подходом к лечению диабетической кардиомиопатии, возможно, будет восстановление баланса между окислением липидов и окислением глюкозы [106].

Чувствительность к инсулину значительно снижается в сердце при диабете как типа I, так и типа II [107]. При ИР сердце находится в среде богатой жирными кислотами и глюкозой, доступность субстратов превышает потребность в синтезе АТФ [38, 99]. Однако использовать глюкозу миоциты не могут, вследствие чего накапливаются промежуточные гликолитические продукты и развивается глюкотоксичность [38]. Избыток инсулина при ИР способствует усилению поглощения СЖК за счёт стимуляции производства белка CD36 (белок кластерной диф-

ференцировки 36), способствующего их переносу [108]. Сердце снижает свою способность использовать СЖК, но активизируется их доставка и происходит накопление внутримиеокардиальных липидов (церамидов, DAG, ацилкарнитинов) [109]. В сердце накапливается большое количество липидов [110], из-за чего развиваются липотоксическая кардиомиопатия и сердечная недостаточность, нарушаются функции митохондрий, развиваются сократительные дисфункции и гипертрофия сердца [111–113].

Сердечно-сосудистые осложнения, которые возникают при диабете, вызваны повышенной активностью протеинкиназы C (PKC, protein kinase C) [107]. Правильно будет говорить о целом семействе изоферментов, различающихся по функциям, особенностям активации и тканевому распределению. В печени, мышцах и жировой ткани PKC являются посредниками и ингибиторами действия инсулина [107, 114]. Передачу сигналов рецептора инсулина подавляют DAG-чувствительные изоформы PKC. Вероятно, именно этот биохимический механизм вызывает резистентность к инсулину в мышцах с нарушением регуляции метаболизма липидов [107, 114].

СЖК могут подавлять передачу сигналов инсулина через церамид на уровне PKB [115]. Интересно, что дефекты мышечного IРец, IRS, PI3K, PKB или атипичных PKC вряд ли могут являться причиной наследственной мышечной ИР, так как отдельные дефекты в этих элементах становятся причиной лишь редких случаев диабета. Искать причину необходимо, вероятно, в специфических дефектах инсулин-стимулируемой транслокации GLUT4 [101].

AMPK увеличивает чувствительность инсулина к потреблению глюкозы в сердце. Она регулирует различные компоненты пути передачи сигналов инсулина [116–118]. Подобно инсулину, AMPK стимулирует поглощение глюкозы и гликолиз в сердце через регуляцию транслокации GLUT4 [116], но при этом противодействует стимулирующему влиянию инсулина на синтез белка, ингибируя mTOR и PKB/Akt-опосредованную активацию рибосомной киназы p70S6K (p70S6 kinase) и фосфорилирование эукариотического фактора элонгации 2 [41, 119]. Инсулин, в свою очередь, также противодействует передаче сигналов AMPK. Активированная PKB/Akt может фосфорилировать AMPK и таким образом подавлять индуцированную ишемией активацию AMPK [120].

После активации инсулином mTOR–p70S6K фосфорилирует IRS-1 по остаткам серина, что приводит к его ингибированию и ухудшению передачи сигналов инсулина. AMPK действует

на инсулин путём ингибирования этой петли отрицательной обратной связи [121]. Однако здесь следует также разделить митогенные и метаболические эффекты. На кардиомиоцитах было показано, что ингибирование mTOR–p70S6K-опосредованной петли отрицательной обратной связи недостаточно для повышения чувствительности к инсулину; и в сердце, вероятно, существуют другие неизвестные пока что механизмы повышения такой чувствительности и стимуляции поглощения глюкозы под воздействием AMPK [122]. Кроме того, AMPK может напрямую стимулировать поглощение глюкозы путём фосфорилирования и инактивации AS160 [123], который является точкой пересечения между сигнальными путями инсулина и AMPK (рисунок).

ИР является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, но и сердечная недостаточность также может провоцировать ИР (из-за потери массы скелетных мышц и малоподвижного образа жизни, о которых мы писали выше, а также из-за гиперактивности симпатической нервной системы и ухудшения эндотелиальной функции). Таким образом, запускается порочный круг, в котором сердечная недостаточность и ИР усугубляют друг друга [38]. Также надо отметить, что, кроме всего прочего, дисфункция сердца при ожирении и сахарном диабете связана с повышенным потреблением кислорода миокардом, снижением эффективности работы сердца и повышенным окислительным стрессом [99].

Сердце обладает очень гибкой метаболической системой, оно легко приспосабливается к потреблению тех субстратов, которые есть в крови в изобилии. При физической нагрузке увеличивается производство лактата скелетными мышцами, в таких случаях сердце переключается на его использование для получения энергии [124]. В свою очередь, продолжительное голодание или кетогенная диета увеличивают уровень кетоновых тел в крови, что приводит к усиленному использованию сердцем этого источника энергии [99]. Кроме того, кетоновые тела используются сердцем в качестве источника для аэробного производства АТФ при сердечно-сосудистых заболеваниях [125]. Считается, что кетоновые тела не могут обеспечить сердце необходимым количеством энергии, однако было показано, что циклическая кетогенная диета помогает старым мышам сохранять «молодой фенотип» сердца [126]. Кетогенная диета (с низким содержанием углеводов и высоким содержанием жиров и белков) увеличивает продолжительность жизни мышей [127]. У людей краткосрочная и среднесрочная низкокалорийная

кетогенная диета помогает бороться с избыточным весом и снижает факторы риска сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, однако неизвестно, какие последствия могут быть у такой диеты в долгосрочной перспективе и подобных данных пока что мало [128]. Эффект кетогенной диеты может быть опосредован подавлением передачи сигналов инсулина и пути mTOR [129].

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В НЕЙРОНАХ

**Проявления возрастных патологий, связанных с инсулинорезистентностью, в нейронах.** Инсулин вызывает множество метаболических, синаптических, нейрональных и поведенческих эффектов в мозге. Эти эффекты влияют на пищевое поведение (ИР в мозге, вероятно, может способствовать увеличению веса [130]), периферический метаболизм и даже когнитивные способности [28, 131]. Старение, ожирение, СДII и деменция приводят к нарушениям действия инсулина в ЦНС. СДII существенно увеличивает риск нейродегенеративных деменций позднего возраста и особенно болезни Альцгеймера [40]. Кроме того, есть основания полагать, что в нейронах, наряду с миоцитами и адипоцитами, развивается индуцированная гиперинсулинемией ИР [42, 132]. Таким образом, ИР в ЦНС может быть патологическим признаком, а в некоторой степени и причиной метаболических и когнитивных дисфункций.

Наблюдается общая тенденция к снижению с возрастом модулирующих влияний предшествующего приёма пищи на активность различных областей мозга, вызванную пищевыми сигналами [133]. На пищевое поведение влияют мозговые сети, отвечающие за аппетит, гедонизм, настроение и память, они сопоставляют внешние раздражители и внутренние физиологические потребности. Исследования пищевого поведения показывают, что введение инсулина в желудочки мозга препятствует потреблению пищи и снижает массу тела. Вероятно, множество поведенческих и метаболических эффектов инсулина в мозге связано с его влиянием на систему подкрепления, гомеостатический и когнитивный контроль [28].

Нейроны чувствительны к инсулину, при этом в головном мозге, как и в поджелудочной железе, уровень экспрессии инсулиновых рецепторов намного ниже, чем в типичных инсулин-чувствительных тканях, а действие инсулина на эти органы обычно не метаболическое [131]. В частности, инсулин оказывает ней-

ротрофическое влияние на периферические нейроны [134]. ИРец экспрессируются во всех типах клеток головного мозга, но неравномерно. Наиболее высокая плотность ИРец наблюдается в обонятельной луковице, гипоталамусе, гиппокампе, коре головного мозга (верхние области коры особенно чувствительны к инсулину), полосатом теле, мозжечке и промежуточной доле гипофиза [135–137]. В нейронах ИРец и IRS экспрессируются и в теле клетки, и на аксонах [42]. ИРец в большом количестве содержатся на пресинаптической и постсинаптической мембране [40] (особенно высока концентрация рецепторов в постсинаптической мембране [138]). Количество ИРец в головном мозге уменьшается с возрастом [139].

В нейронах основным переносчиком глюкозы является независимый от инсулина GLUT3, а в сосудах гематоэнцефалического барьера и глие — базальный переносчик GLUT1, оба обладают высоким сродством к глюкозе, что позволяет обеспечивать мозг глюкозой, даже когда её уровень в крови низкий [45]. При гипогликемии клетки глии поглощают глюкозу через GLUT1, перерабатывают её до лактата и уже этот альтернативный источник энергии транспортируют к нейронам («лактатный челнок») [140, 141]. Считается, что данный процесс запускается, когда мозгу нужно много энергии, однако его вклад в обеспечение мозга питательными веществами всё ещё не определён [40]. Помимо GLUT3, в мозге также экспрессируется регулируемый инсулином GLUT4. Считается, что GLUT4 есть в тех областях мозга, которые отвечают за когнитивные способности (передний мозг, гиппокамп, миндалина, кора головного мозга и мозжечок [142]), так как в таких областях требуется больший приток глюкозы из-за высокой метаболической потребности, развивающейся при обучении [40].

Циркулирующий в крови инсулин связывается с рецепторами на эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера, откуда он далее транспортируется в интерстициальную жидкость головного мозга [143]. При ИР снижается активность транспорта инсулина через гематоэнцефалический барьер, также на транспорт инсулина влияют сахарный диабет, ожирение, воспаление, гликемия и уровни циркулирующих в крови триглицеридов [40]. Инсулин связывается со своими многочисленными рецепторами, расположенными в разных отделах головного мозга, в том числе обонятельной луковице, коре головного мозга, гиппокампе, гипоталамусе, миндалине и др. [28]. После связывания со своим рецептором, как и в периферических тканях, инсулин индуцирует тирозинки-

назную активность, вследствие чего происходит аутофосфорилирование рецептора, а также фосфорилирование тирозиновых остатков IRS. IRS-1 и IRS-2 активируют метаболический и митогенный сигнальные пути. Обе формы IRS экспрессируются в нейронах и в астроцитах [40]. ИР в нейронах может развиваться через гиперинсулинизм и нарушение PKB/Akt-пути [132]. Снижение передачи сигналов PKB/Akt является общим признаком нейрональной дисфункции. Существует гипотеза, согласно которой ИР ускоряет появление дисфункции нейронов, не позволяя им реагировать на нейротрофическое действие инсулина и делая их более восприимчивыми к различным повреждающим стимулам [42].

Так как исследований, посвящённых ИР нейронов, очень мало, ещё многое в этой области непонятно. Очень сложно разделить ИР в нейронах и в глии [42]. Глия может оказывать значительное влияние на ИР нейронов.

**Другие возрастные метаболические нарушения в нейронах.** Если для развития мышц важен только mTORC1, то для развития мозга важны оба комплекса [37]. mTOR участвует в самых разных процессах в мозге, например, в нейронном контроле питания, а дисфункция пути mTOR может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний, аутизму и эпилепсии [144].

АМРК является крайне важным метаболическим датчиком в ЦНС. В мозге она активируется в условиях нехватки энергии, вызванных гипоксией, голоданием и ишемическим инсультом. АМРК участвует в регуляции энергетического баланса не только отдельных клеток (автономная регуляция), она также может оказывать влияние на пищевое поведение через гипоталамус (системная регуляция), так как её активацию могут вызывать не только физиологические стимулы, но и гормональные сигналы. Системная регуляция работает в том числе и у беспозвоночных; например, тканеспецифичная нейрональная активация АМРК у дрозофилы не только индуцирует аутофагию в мозге, но и улучшает гомеостаз тканей кишечника [5]. Действие АМРК направлено на защиту клеток мозга от нехватки энергии, однако избыточная или чрезмерная её активация может приводить к негативным последствиям [31, 145]. Некорректная регуляция АМРК связана с такими заболеваниями головного мозга, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и инсульт [146]. Одним из метаболических эффектов АМРК в мозге может быть её свойство способствовать экспрессии GLUT4 или GLUT1

[117, 147], за счёт чего увеличиваются скорость утилизации глюкозы и продукция АТФ.

Как и в случае с мышцами, для нервных клеток важен метаболизм аминокислот. Например, незаменимая аминокислота триптофан является единственным предшественником серотонина. Метаболизм этой аминокислоты может иметь большое значение для пожилых людей, даже несмотря на то, что для синтеза белка используется менее 1% пищевого триптофана [148]. Потребление этой аминокислоты является яркой иллюстрацией тесной связи мышечной и нервной систем. Умеренные физические упражнения стимулируют метаболизм триптофана, потому что мышцы активно используют аминокислоты с разветвлённой цепью, вследствие чего он становится более доступным для мозга [75]. Регулярные упражнения на выносливость могут быть рекомендованы даже лицам с депрессивными расстройствами, так как они вызывают увеличение экспрессии кинуренин-аминотрансферазы в скелетных мышцах, что переключает метаболизм кинуренина на производство кинурениновой кислоты, которая не проходит через гематоэнцефалический барьер. Это предотвращает нарушение нервной пластичности. Что же касается ограничения энергии, то оно, напротив, приводит к низкому уровню триптофана, а это влечёт за собой нарушения в метаболизме серотонина [149]. Одной только диетой с высоким содержанием белка нельзя получить больше триптофана, так как в этом случае его доступность для мозга окажется парадоксальным образом сниженной из-за конкуренции с другими крупными нейтральными аминокислотами за транспорт через гематоэнцефалический барьер [148]. Таким образом, высокое потребление белка без тренировок ограничивает доступность триптофана, что может дополнительно влиять на синтез серотонина и нарушать познавательные способности, память, настроение и сон, а это, в конечном итоге, увеличивает риск развития деменции [148].

**Возрастная потеря нейронов.** Количество нервных клеток, как и мышечных волокон, уменьшается с возрастом. Более того, потеря мышечных волокон связана с потерей иннервирующих их моторных нейронов [43]. Несмотря на постоянную гибель нейронов, заметным сокращением их числа становится только в поздние возрастные периоды, когда начинают проявляться функциональные нарушения [150]. В вентральных корешках спинного мозга у человека обнаруживается уменьшение не только количества миелинизированных нервных волокон, но и их диаметра [151, 152]. Уменьшение количества миелинизированных волокон со-

ставляет около 5% за десятилетие [151]. Количество двигательных нейронов в пояснично-крестцовых сегментах спинного мозга здоровых людей после 60 лет может составлять примерно 50% от этого показателя в молодом и среднем возрасте [153]. Возрастная потеря нейронов происходит также в отдельных ганглиях (например, в вестибулярном ганглии [154, 155]) и в разных отделах головного мозга (например, в гиппокампе [156], в стволе мозга и мозжечке [155], в коре больших полушарий [157, 158], в миндалевидном теле [159] и в таламусе [160]). В опытах на крысах было установлено, что прогрессирующая потеря нейронов во всех структурах начинается не в позднем возрасте, а после 3 мес. жизни, когда происходит завершение подросткового периода у крыс [150].

Надо отметить, что в разных отделах головного мозга потери различаются: какие-то из них почти не теряют клетки, в то время как в других такие потери могут быть весьма большими. Довольно часто встречаются работы, в которых сообщается о том, что у людей и животных без нейродегенеративных заболеваний возрастная потеря нейронов преувеличена, а уменьшение объема тех или иных отделов может происходить лишь из-за сокращения числа отростков нервных клеток и межклеточных контактов [161–164]. В некоторых работах даже сообщается, что с возрастом погибает гораздо больше глиальных клеток, чем нервных [165], однако в других исследованиях обнаруживают, что глиальных клеток с возрастом может стать больше [166]. Методическая сложность количественной оценки, а также сложность устройства мозга и необходимость сравнения лишь данных поперечных исследований (а в случае с людьми — ещё и недостаточно большие выборки), вероятно, пока не позволяют определить очень точно, как всё-таки меняется количество нейронов и глиальных клеток в мозге. Однако даже если падает количество нейронов лишь в некоторых отделах и частях мозга, то это всё равно нарушает его работу и способствует развитию когнитивных нарушений.

### **О КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТАРЕНИЯ ПОСТМИТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Хотелось бы также кратко коснуться геронтологических исследований метаболических процессов в экспериментах на культивируемых клетках. Существует несколько моделей клеточного старения, и все они имеют свои преимущества и недостатки. На наш взгляд, моделирова-

ние клеточного старения, при котором изучают так называемые «сенесцентные» клетки (модель Хейфлика [167] и модель стресс-индуцированного преждевременного старения [168]), крайне полезно для изучения старения клеток организма, способных к пролиферации и обновлению в течение всей жизни организма. К ним применима концепция Campisi [169] о том, что клетки переходят в сенесцентное состояние, чтобы не стать раковыми. Высокодифференцированные нейроны и миоциты во взрослом организме не способны делиться и не превращаются в раковые, поэтому для моделирования их старения должна, вероятно, существовать другая модель. Считается, что старение таких тканей можно изучать с помощью модели хронологического старения (преимущественно на дрожжах) или «стационарного» старения применительно к клеткам животных или человека [9, 14, 170–173], которое изучается в течение долгого времени в нашей лаборатории. Хронологическое старение подразумевает остановку пролиферации тем или иным способом и последующее определение выживаемости клеток при длительном их пребывании в стационарной фазе. Конечно же, у такого подхода очень много недостатков, но лучший вариант пока не придуман, и, кроме того, с помощью этих моделей действительно получают данные [15–17], соответствующие данным на животных. Наиболее адекватными, на наш взгляд, станут такие модели, в которых будут использованы клетки животных и человека с вызванной у них терминальной дифференцировкой, хотя это потребует больших финансовых затрат. Таким образом, сенесцентные клетки могут влиять на выживаемость высокодифференцированных клеток, но последние стареют, вероятно, не так, как первые, хотя общие черты, скорее всего, будут прослеживаться. Для высокодифференцированных клеток большое значение имеет аутофагия, так как обновление компонентов клетки возможно только за счёт неё [77, 174]. Популяция же делящихся клеток может избегать накопления дефектов, которые появляются со временем в постмитотических дифференцированных клетках, за счёт замены накопивших повреждения старых клеток новыми (как, например, в эпителии кишечника). Видимо, с этим и связан тот факт, что липофусцин наиболее заметно откладывается в постмитотических высокодифференцированных клетках — нервных и мышечных [175], но не в активно пролиферирующих (исключение составляют клетки кожи). Однако в случае со скелетными мышцами обнаруживается, что пролиферирующим сателлитным клеткам мышц также нужна аутофагия (о чём уже

было сказано выше), что может свидетельствовать о некотором сходстве процессов деградации клеток в моделях пролиферативного и хронологического/стационарного старения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всё изложенное выше тем не менее ничего не говорит нам о том, что первично — нарушения в самих постмитотических клетках или нарушения в окружении этих клеток и приносящих кровь сосудах. Влияние на нейроны и миоциты могут оказывать сенесцентные клетки из окружающих обновляющихся тканей. Проблемы могут возникать в органах, состоящих из постмитотических клеток, вторично: из-за атеросклероза сосудов нарушается кровоснабжение мозга, из-за кальцификации — перфузия скелетных мышц [176] и т.п. Известно, что нарушение кровообращения головного мозга является фактором, предрасполагающим к развитию болезни Альцгеймера [177]. Кровообращение в мышцах ухудшается с возрастом, а именно: нарушается способность сосудов расширяться. Это может происходить по разным причинам:

нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации, увеличение жёсткости сосудов, избыточное влияние симпатической нервной системы, изменения метаболического или миогенного контроля, снижение эффективности насоса скелетных мышц [178]. Понять, что первично, а что вторично, и установить причинно-следственные связи очень сложно. Судя по всему, все эти нарушения связаны между собой и могут развиваться параллельно. Нам кажется, что рассмотренные в настоящем обзоре геронтологические аспекты возникновения ИР и её последствий являются хорошей иллюстрацией очень сложного характера взаимосвязи различных возрастных метаболических нарушений.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-14-50394.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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, *J. Nutr.*, **10**, 63-79, doi: 10.1093/jn/10.1.63.
- Lane, M. A., Ingram, D. K., and Roth, G. S. (1997) Beyond the rodent model: calorie restriction in rhesus monkeys, *Age*, **20**, 45-56, doi: 10.1007/s11357-997-0004-2.
- 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.
- Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz, J. W., Johnson, S. C., Weindruch, R., and Anderson, R. M. (2014) Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys, *Nat. Commun.*, **5**, 3557, doi: 10.1038/ncomms4557.
- Ulgherait, M., Rana, A., Rera, M., Graniel, J., and Walker, D. W. (2014) AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner, *Cell Rep.*, **8**, 1767-1780, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.006.
- Cokorinos, E. C., Delmore, J., Reyes, A. R., Albuquerque, B., Kjøbsted, R., et al. (2017) Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-human primates and mice, *Cell Metab.*, **25**, 1147-1159, doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.010.
- Amara, C. E., Shankland, E. G., Jubrias, S. A., Marcinek, D. J., Kushmerick, M. J., and Conley, K. E. (2007) Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1057-1062, doi: 10.1073/pnas.0610131104.
- Mookerjee, S. A., Divakaruni, A. S., Jastroch, M., and Brand, M. D. (2010) Mitochondrial uncoupling and lifespan, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 463-472, doi: 10.1016/j.mad.2010.03.010.
- Leontieva, O. V., and Blagosklonny, M. V. (2011) Yeast-like chronological senescence in mammalian cells: phenomenon, mechanism and pharmacological suppression, *Aging (Albany N.Y.)*, **3**, 1078-1091, doi: 10.18632/aging.100402.
- Morgunova, G. V., Klebanov, A. A., Marotta, F., and Khokhlov, A. N. (2017) Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **72**, 47-51, doi: 10.3103/S0096392517020109.
- Khokhlov, A. N. (2018) Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **73**, 185-190, doi: 10.3103/S0096392518040041.
- Khokhlov, A. N., Morgunova, G. V., and Klebanov, A. A. (2019) Demographic approaches to the study of aging on cell cultures, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **74**, 262-267, doi: 10.3103/S0096392519040060.
- Sampaio-Marques, B., Burhans, W. C., and Ludovico, P. (2019) In *Yeasts in biotechnology and human health. Progress in molecular and subcellular biology* (Sá-Correia I., ed.) Vol. 58, Springer, Cham, pp. 217-242.
- Yang, Y., Santos, A. L., Xu, L., Lotton, C., Taddei, F., and Lindner, A. B. (2019) Temporal scaling of aging as an adaptive strategy of *Escherichia coli*, *Sci. Adv.*, **5**, eaaw2069, doi: 10.1126/sciadv.aaw2069.
- Powers, R. W., Kaerberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K., and Fields, S. (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling, *Genes Dev.*, **20**, 174-184, doi: 10.1101/gad.1381406.
- Alvers, A. L., Wood, M. S., Hu, D., Kaywell, A. C., Dunn, Jr, W. A., and Aris, J. P. (2009) Autophagy is required for

- extension of yeast chronological life span by rapamycin, *Autophagy*, **5**, 847-849, doi: 10.4161/auto.8824.
17. Wierman, M. B., Maqani, N., Strickler, E., Li, M., and Smith, J. S. (2017) Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by optimizing the Snf1 (AMPK) signaling pathway, *Mol. Cell Biol.*, **37**, e00562-16, doi: 10.1128/MCB.00562-16.
  18. Krejčí, A. (2012) Metabolic sensors and their interplay with cell signalling and transcription, *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 311-323, doi: 10.1042/BST20110767.
  19. Sperling, M. A., Ganguli, S., Leslie, N., and Landt, K. (1984) Fetal-perinatal catecholamine secretion: role in perinatal glucose homeostasis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **247**, E69-E74, doi: 10.1152/ajpendo.1984.247.1.E69.
  20. Hellström, A., Ley, D., Hansen-Pupp, I., Hallberg, B., Ramenghi, L. A., et al. (2016) Role of insulinlike growth factor 1 in fetal development and in the early postnatal life of premature infants, *Am. J. Perinatol.*, **33**, 1067-1071, doi: 10.1055/s-0036-1586109.
  21. Jousse, C., Parry, L., Lambert-Langlais, S., Maurin, A. C., Averous, J., et al. (2011) Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome, *FASEB J.*, **25**, 3271-3278, doi: 10.1096/fj.11-181792.
  22. Li, Y., Jaddoe, V. W., Qi, L., He, Y., Wang, D., et al. (2011) Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of metabolic syndrome in adulthood, *Diabetes Care*, **34**, 1014-1018, doi: 10.2337/dc10-2039.
  23. Marciniak, A., Patro-Małyśza, J., Kimber-Trojnar, Ż., Marciniak, B., Oleszczuk, J., and Leszczyńska-Gorzelak, B. (2017) Fetal programming of the metabolic syndrome, *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, **56**, 133-138, doi: 10.1016/j.tjog.2017.01.001.
  24. Zabuga, O. G., and Vaiserman, A. M. (2017) Malnutrition in early life and risk of type 2 diabetes: theoretical framework and epidemiological evidence, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **72**, 37-46, doi: 10.3103/S0096392517020067.
  25. Vaiserman, A. M. (2018) Birth weight predicts aging trajectory: a hypothesis, *Mech. Ageing Dev.*, **173**, 61-70, doi: 10.1016/j.mad.2018.04.003.
  26. Yan, S., Hou, W., Wu, H., Jiang, W., Li, Y., et al. (2020) Prenatal exposure to the Chinese famine and the risk of metabolic syndrome in adulthood across consecutive generations, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **74**, 1229-1236, doi: 10.1038/s41430-020-0561-3.
  27. Vogt, M. C., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S. M., Awazawa, M., et al. (2014) Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding, *Cell*, **156**, 495-509, doi: 10.1016/j.cell.2014.01.008.
  28. Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H., and Häring, H. U. (2016) Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans, *Physiol. Rev.*, **96**, 1169-1209, doi: 10.1152/physrev.00032.2015.
  29. Hardie, D. G., Schaffer, B. E., and Brunet, A. (2016) AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs, *Trends Cell Biol.*, **26**, 190-201, doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.013.
  30. Jeon, S. M. (2016) Regulation and function of AMPK in physiology and diseases, *Exp. Mol. Med.*, **48**, e245, doi: 10.1038/emm.2016.81.
  31. Morgunova, G. V., and Klebanov, A. A. (2019) Age-related AMP-activated protein kinase alterations: from cellular energetics to longevity, *Cell Biochem. Funct.*, **37**, 169-176, doi: 10.1002/cbf.3384.
  32. González, A., and Hall, M. N. (2017) Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals, *EMBO J.*, **36**, 397-408, doi: 10.15252/embo.201696010.
  33. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Growing roles for the mTOR pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 596-603, doi: 10.1016/j.ceb.2005.09.009.
  34. Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., et al. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice, *Nature*, **460**, 392-395, doi: 10.1038/nature08221.
  35. Bjedov, I., Toivonen, J. M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., et al. (2010) Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, *Cell Metab.*, **11**, 35-46, doi: 10.1016/j.cmet.2009.11.010.
  36. Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D. W., Mizunuma, M., Narasimhan, S. D., et al. (2012) TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO, *Cell Metab.*, **15**, 713-724, doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.007.
  37. Saxton, R. A., and Sabatini, D. M. (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease, *Cell*, **168**, 960-976, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
  38. Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., and Zúñiga, F. A. (2018) Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease, *Cardiovasc. Diabetol.*, **17**, 122, doi: 10.1186/s12933-018-0762-4.
  39. Petersen, M. C., and Shulman, G. I. (2018) Mechanisms of insulin action and insulin resistance, *Physiol. Rev.*, **98**, 2133-2223, doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
  40. Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H. Y., et al. (2018) Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums, *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 168-181, doi: 10.1038/nrneurol.2017.185.
  41. Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C., and Vanoverschelde, J. L. (2008) Insulin signalling in the heart, *Cardiovasc. Res.*, **79**, 238-248, doi: 10.1093/cvr/cvn093.
  42. Kim, B., and Feldman, E. L. (2012) Insulin resistance in the nervous system, *Trends Endocrinol. Metab.*, **23**, 133-141, doi: 10.1016/j.tem.2011.12.004.
  43. Vandervoort, A. A. (2002) Aging of the human neuromuscular system, *Muscle Nerve*, **25**, 17-25, doi: 10.1002/mus.1215.
  44. Frontera, W. R., and Ochala, J. (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function, *Calcif. Tissue Int.*, **96**, 183-195, doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.
  45. Wilcox, G. (2005) Insulin and insulin resistance, *Clin. Biochem. Rev.*, **26**, 19-39.
  46. Stenvers, D. J., Scheer, F. A., Schrauwen, P., la Fleur, S. E., and Kalsbeek, A. (2019) Circadian clocks and insulin resistance, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **15**, 75-89, doi: 10.1152/physrev.00032.2015.
  47. Chavez, J. A., and Summers, S. A. (2012) A ceramide-centric view of insulin resistance, *Cell Metab.*, **15**, 585-594, doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.002.
  48. Muoio, D. M., and Neuffer, P. D. (2012) Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle, *Cell Metab.*, **15**, 595-605, doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.010.
  49. Bouzakri, K., Zachrisson, A., Al-Khalili, L., Zhang, B. B., Koistinen, H. A., et al. (2006) siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle, *Cell Metab.*, **4**, 89-96, doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.008.
  50. Huang, C., Thirone, A. C., Huang, X., and Klip, A. (2005) Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes, *J. Biol. Chem.*, **280**, 19426-19435, doi: 10.1074/jbc.M412317200.
  51. Latva-Rasku, A., Honka, M. J., Stančáková, A., Koistinen, H. A., Kuusisto, J., et al. (2018) A partial loss-of-function variant in *AKT2* is associated with reduced

- insulin-mediated glucose uptake in multiple insulin-sensitive tissues: a genotype-based callback positron emission tomography study, *Diabetes*, **67**, 334-342, doi: 10.2337/db17-1142.
52. Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., et al. (2000) Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle, *J. Clin. Invest.*, **105**, 311-320, doi: 10.1172/JCI17535.
  53. Unger, R. H. (2003) Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome, *Endocrinology*, **144**, 5159-5165, doi: 10.1210/en.2003-0870.
  54. Reppert, S. M., and Weaver, D. R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals, *Nature*, **418**, 935-941, doi: 10.1038/nature00965.
  55. Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks, *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 517-549, doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821.
  56. Yamanaka, Y., Honma, S., and Honma, K. I. (2008) Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles, *Genes Cells*, **13**, 497-507, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01183.x.
  57. Wolff, G., and Esser, K. A. (2012) Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **44**, 1663-1670, doi: 10.1249/MSS.0b013e318255cf4c.
  58. Hawke, T. J., and Garry, D. J. (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology, *J. Appl. Physiol.*, **91**, 534-551, doi: 10.1152/jappl.2001.91.2.534.
  59. Campanario, S., Ramírez-Pardo, I., Hong, X., Isern, J., and Muñoz-Cánoves, P. (2021) Assessing autophagy in muscle stem cells, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 620409, doi: 10.3389/fcell.2020.620409.
  60. Srikanthan, P., and Karlamangla, A. S. (2011) Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, 2898-2903, doi: 10.1210/jc.2011-0435.
  61. Brito, E. C., Lyssenko, V., Renström, F., Berglund, G., Nilsson, P. M., et al. (2009) Previously associated type 2 diabetes variants may interact with physical activity to modify the risk of impaired glucose regulation and type 2 diabetes: a study of 16,003 Swedish adults, *Diabetes*, **58**, 1411-1418, doi: 10.2337/db08-1623.
  62. Waller, K., Kaprio, J., Lehtovirta, M., Silventoinen, K., Koskenvuo, M., and Kujala, U. M. (2010) Leisure-time physical activity and type 2 diabetes during a 28 year follow-up in twins, *Diabetologia*, **53**, 2531-2537, doi: 10.1007/s00125-010-1875-9.
  63. InterAct Consortium (2012) Physical activity reduces the risk of incident type 2 diabetes in general and in abdominally lean and obese men and women: the EPIC-InterAct Study, *Diabetologia*, **55**, 1944-1952, doi: 10.1007/s00125-012-2532-2.
  64. Kujala, U. M., Mäkinen, V. P., Heinonen, I., Soininen, P., Kangas, A. J., et al. (2013) Long-term leisure-time physical activity and serum metabolome, *Circulation*, **127**, 340-348, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.105551.
  65. DiMenna, F. J., and Arad, A. D. (2018) Exercise as 'precision medicine' for insulin resistance and its progression to type 2 diabetes: a research review, *BMC Sports Sci. Med. Rehabilitation*, **10**, 21, doi: 10.1186/s13102-018-0110-8.
  66. Zanuso, S., Sacchetti, M., Sundberg, C. J., Orlando, G., Benvenuti, P., and Balducci, S. (2017) Exercise in type 2 diabetes: genetic, metabolic and neuromuscular adaptations. A review of the evidence, *Br. J. Sports Med.*, **51**, 1533-1538, doi: 10.1136/bjsports-2016-096724.
  67. Jarvie, J. L., Pandey, A., Ayers, C. R., McGavock, J. M., Sénéchal, M., et al. (2019) Aerobic fitness and adherence to guideline-recommended minimum physical activity among ambulatory patients with type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Care*, **42**, 1333-1339, doi: 10.2337/dc18-2634.
  68. Yang, D., Yang, Y., Li, Y., and Han, R. (2019) Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus: from mechanism to orientation, *Ann. Nutr. Metab.*, **74**, 313-321, doi: 10.1159/000500110.
  69. Volaklis, K. A., Halle, M., and Meisinger, C. (2015) Muscular strength as a strong predictor of mortality: a narrative review, *Eur. J. Intern. Med.*, **26**, 303-310, doi: 10.1016/j.ejim.2015.04.013.
  70. Kraschnewski, J. L., Sciamanna, C. N., Poger, J. M., Rovniak, L. S., Lehman, E. B., et al. (2016) Is strength training associated with mortality benefits? A 15 year cohort study of US older adults, *Prev. Med.*, **87**, 121-127, doi: 10.1016/j.ypmed.2016.02.038.
  71. Atlantis, E., Martin, S. A., Haren, M. T., Taylor, A. W., and Wittert, G. A. (2009) Inverse associations between muscle mass, strength, and the metabolic syndrome, *Metabolism*, **58**, 1013-1022, doi: 10.1016/j.metabol.2009.02.027.
  72. Kim, G., Lee, S. E., Jun, J. E., Lee, Y. B., Ahn, J., et al. (2018) Increase in relative skeletal muscle mass over time and its inverse association with metabolic syndrome development: a 7-year retrospective cohort study, *Cardiovasc. Diabetol.*, **17**, 23, doi: 10.1186/s12933-018-0659-2.
  73. Nomura, K., Eto, M., Ogawa, S., Kojima, T., Iijima, K., et al. (2020) Association between low muscle mass and metabolic syndrome in elderly Japanese women, *PLoS One*, **15**, e0243242, doi: 10.1371/journal.pone.0243242.
  74. Srikanthan, P., Hevener, A. L., and Karlamangla, A. S. (2010) Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III, *PLoS One*, **5**, e10805, doi: 10.1371/journal.pone.0010805.
  75. Strasser, B., and Fuchs, D. (2015) Role of physical activity and diet on mood, behavior, and cognition, *Neurol. Psychol. Brain Res.*, **21**, 118-126, doi: 10.1016/j.npbr.2015.07.002.
  76. McLeod, M., Breen, L., Hamilton, D. L., and Philp, A. (2016) Live strong and prosper: the importance of skeletal muscle strength for healthy ageing, *Biogerontology*, **17**, 497-510, doi: 10.1007/s10522-015-9631-7.
  77. De Mario, A., Gherardi, G., Rizzuto, R., and Mammucari, C. (2021) Skeletal muscle mitochondria in health and disease, *Cell Calcium*, **94**, 102357, doi: 10.1016/j.ceca.2021.102357.
  78. Goodpaster, B. H., Park, S. W., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Nevitt, M., et al. (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **61**, 1059-1064, doi: 10.1093/gerona/61.10.1059.
  79. Qiang, W., Weiqiang, K., Qing, Z., Pengju, Z., and Yi, L. (2007) Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPK $\alpha$ , *Exp. Mol. Med.*, **39**, 535-543, doi: 10.1038/emmm.2007.59.
  80. Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2012) AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network, *Ageing Res. Rev.*, **11**, 230-241, doi: 10.1016/j.arr.2011.12.005.
  81. Lai, Y. C., Kviklyte, S., Vertommen, D., Lantier, L., Foretz, M., et al. (2014) A small-molecule benzimidazole derivative that potently activates AMPK to increase glucose transport in skeletal muscle: comparison with effects of contraction and other AMPK activators, *Biochem. J.*, **460**, 363-375, doi: 10.1042/BJ20131673.

82. Bentzinger, C. F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J. B., et al. (2008) Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy, *Cell Metab.*, **8**, 411-424, doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.002.
83. Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., et al. (2009) Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy, *J. Cell Biol.*, **187**, 859-874, doi: 10.1083/jcb.200903131.
84. Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., et al. (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*, *Nat. Cell Biol.*, **3**, 1014-1019, doi: 10.1038/ncb1101-1014.
85. Castets, P., Lin, S., Rion, N., Di Fulvio, S., Romanino, K., Guridi, M., et al. (2013) Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy, *Cell Metab.*, **17**, 731-744, doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.015.
86. Drummond, M. J., Fry, C. S., Glynn, E. L., Dreyer, H. C., Dhanani, S., et al. (2009) Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis, *J. Physiol.*, **587**, 1535-1546, doi: 10.1113/jphysiol.2008.163816.
87. Dickinson, J. M., Fry, C. S., Drummond, M. J., Gundermann, D. M., Walker, D. K., et al. (2011) Mammalian target of rapamycin complex 1 activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids, *J. Nutr.*, **141**, 856-862, doi: 10.3945/jn.111.139485.
88. Mazzilli, K. M., Matthews, C. E., Salerno, E. A., and Moore, S. C. (2019) Weight training and risk of 10 common types of cancer, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **51**, 1845-1851, doi: 10.1249/MSS.0000000000001987.
89. Rezende, L. F., Lee, D. H., Keum, N., Wu, K., Eluf-Neto, J., et al. (2020) Resistance training and total and site-specific cancer risk: a prospective cohort study of 33,787 US men, *Br. J. Cancer*, **123**, 666-672, doi: 10.1038/s41416-020-0921-8.
90. Olesen, A. T., Malchow-Møller, L., Bendixen, R. D., Kjær, M., Svensson, R. B., et al. (2021) Age-related myofiber atrophy in old mice is reversed by ten weeks voluntary high-resistance wheel running, *Exp. Gerontol.*, **143**, 111150, doi: /10.1016/j.exger.2020.111150.
91. Аршавский И. А. (1982) *Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. Основы негэнтропийной теории онтогенеза*. Наука, Москва, 270 с.
92. Kurismaa, A. (2021) The negentropic theory of ontogeny: a new model of eutherian life history transitions? *Biosemiotics*, doi: 10.1007/s12304-021-09408-0.
93. Palla, A. R., Ravichandran, M., Wang, Y. X., Alexandrova, L., Yang, A. V., et al. (2021) Inhibition of prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH rejuvenates aged muscle mass and strength, *Science*, **371**, eabc8059, doi: 10.1126/science.abc8059.
94. Churchward-Venne, T. A., Holwerda, A. M., Phillips, S. M., and van Loon, L. J. (2016) What is the optimal amount of protein to support post-exercise skeletal muscle reconditioning in the older adult? *Sports Med.*, **46**, 1205-1212, doi: 10.1007/s40279-016-0504-2.
95. Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Walker, D. K., Reidy, P. T., Borack, M. S., et al. (2014) Leucine-enriched amino acid ingestion after resistance exercise prolongs myofibrillar protein synthesis and amino acid transporter expression in older men, *J. Nutr.*, **144**, 1694-1702, doi: 10.3945/jn.114.198671.
96. Leenders, M., and van Loon, L. J. (2011) Leucine as a pharmacconutrient to prevent and treat sarcopenia and type 2 diabetes, *Nutr. Rev.*, **69**, 675-689, doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00443.x.
97. Wall, B. T., Hamer, H. M., de Lange, A., Kiskini, A., Groen, B. B., Senden, J. M., et al. (2013) Leucine co-ingestion improves post-prandial muscle protein accretion in elderly men, *Clin. Nutr.*, **32**, 412-419, doi: 10.1016/j.clnu.2012.09.002.
98. Rennie, M., and Wilkes, E. A. (2005) Maintenance of the musculoskeletal mass by control of protein turnover: the concept of anabolic resistance and its relevance to the transplant recipient, *Ann. Transplant.*, **10**, 31-34.
99. Kolwicz, Jr., S. C., Purohit, S., and Tian, R. (2013) Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes, *Circ. Res.*, **113**, 603-616, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095.
100. Schaper, J., Meiser, E., and Stämmler, G. (1985) Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts, *Circ. Res.*, **56**, 377-391, doi: 10.1161/01.RES.56.3.377.
101. Taegtmeier, H., McNulty, P., and Young, M. E. (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts, *Circulation*, **105**, 1727-1733, doi: 10.1161/01.CIR.0000012466.50373.E8.
102. Taegtmeier, H., Hems, R., and Krebs, H. A. (1980) Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart, *Biochem. J.*, **186**, 701-711, doi: 10.1042/bj1860701.
103. Henning, S. L., Wambolt, R. B., Schönekeess, B. O., Lopaschuk, G. D., and Allard, M. F. (1996) Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization, *Circulation*, **93**, 1549-1555, doi: 10.1161/01.CIR.93.8.1549.
104. Tian, R., and Abel, E. D. (2001) Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis, *Circulation*, **103**, 2961-2966, doi: 10.1161/01.CIR.103.24.2961.
105. Ginsberg, H. N., Zhang, Y. L., and Hernandez-Ono, A. (2006) Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia, *Obesity*, **14**, 41S-49S, doi: 10.1038/oby.2006.281.
106. Ramírez, E., Picatoste, B., González-Bris, A., Oteo, M., Cruz, F., et al. (2018) Sitagliptin improved glucose assimilation in detriment of fatty-acid utilization in experimental type-II diabetes: role of GLP-1 isoforms in Glut4 receptor trafficking, *Cardiovasc. Diabetol.*, **17**, 12, doi: 10.1186/s12933-017-0643-2.
107. Davidoff, A. J., Davidson, M. B., Carmody, M. W., Davis, M. E., and Ren, J. (2004) Diabetic cardiomyocyte dysfunction and myocyte insulin resistance: role of glucose-induced PKC activity, *Mol. Cell. Biochem.*, **262**, 155-163, doi: 10.1023/B:MCBI.0000038231.68078.4b.
108. Su, X., and Abumrad, N. A. (2009) Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction, *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**, 72-77, doi: 10.1016/j.tem.2008.11.001.
109. D'Souza, K., Nziroera, C., and Kienesberger, P. C. (2016) Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1861**, 1513-1524, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.02.016.
110. Szczepaniak, L. S., Victor, R. G., Orci, L., and Unger, R. H. (2007) Forgotten but not gone: the rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America, *Circ. Res.*, **101**, 759-767, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160457.
111. Goldberg, I. J., Trent, C. M., and Schulze, P. C. (2012) Lipid metabolism and toxicity in the heart, *Cell Metab.*, **15**, 805-812, doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.006.
112. Fricovsky, E. S., Suarez, J., Ihm, S. H., Scott, B. T., Suarez-Ramirez, J. A., et al. (2012) Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic car-

- diomyopathy, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **303**, R689-R699, doi: 10.1152/ajpregu.00548.2011.
113. Liu, Y., Neumann, D., Glatz, J. F., and Luiken, J. J. (2018) Molecular mechanism of lipid-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **136**, 131-141, doi: 10.1016/j.plefa.2016.06.002.
  114. Idris, I., Gray, S., and Donnelly, R. (2001) Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes, *Diabetologia*, **44**, 659-673, doi: 10.1007/s001250051675.
  115. Schmitz-Peiffer, C., Craig, D. L., and Biden, T. J. (1999) Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate, *J. Biol. Chem.*, **274**, 24202-24210, doi: 10.1074/jbc.274.34.24202.
  116. Dolinsky, V. W., and Dyck, J. R. (2006) Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**, H2557-H2569, doi: 10.1152/ajpheart.00329.2006.
  117. Dyck, J. R., and Lopaschuk, G. D. (2006) AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J. Physiol.*, **574**, 95-112, doi: 10.1113/jphysiol.2006.109389.
  118. Towler, M. C., and Hardie, D. G. (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling, *Circ. Res.*, **100**, 328-341, doi: 10.1161/01.RES.0000256090.42690.05.
  119. Chan, A. Y., Soltys, C. L. M., Young, M. E., Proud, C. G., and Dyck, J. R. (2004) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte, *J. Biol. Chem.*, **279**, 32771-32779, doi: 10.1074/jbc.M403528200.
  120. Kovacic, S., Soltys, C. L. M., Barr, A. J., Shiojima, I., Walsh, K., and Dyck, J. R. (2003) Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart, *J. Biol. Chem.*, **278**, 39422-39427, doi: 10.1074/jbc.M305371200.
  121. Takano, A., Usui, I., Haruta, T., Kawahara, J., Uno, T., et al. (2001) Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5050-5062, doi: 10.1128/MCB.21.15.5050-5062.2001.
  122. Ginion, A., Auquier, J., Benton, C. R., Mouton, C., Vanoverschelde, J. L., et al. (2011) Inhibition of the mTOR/p70S6K pathway is not involved in the insulin-sensitizing effect of AMPK on cardiac glucose uptake, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H469-H477, doi: 10.1152/ajpheart.00986.2010.
  123. Kramer, H. F., Witczak, C. A., Fujii, N., Jessen, N., Taylor, E. B., et al. (2006) Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle, *Diabetes*, **55**, 2067-2076, doi: 10.2337/db06-0150.
  124. Goodwin, G. W., and Taegtmeier, H. (2000) Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H1490-H1501, doi: 10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1490.
  125. Aubert, G., Martin, O. J., Horton, J. L., Lai, L., Vega, R. B., et al. (2016) The failing heart relies on ketone bodies as a fuel, *Circulation*, **133**, 698-705, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017355.
  126. Newman, J. C., Covarrubias, A. J., Zhao, M., Yu, X., Gut, P., et al. (2017) Ketogenic diet reduces midlife mortality and improves memory in aging mice, *Cell Metab.*, **26**, 547-557, doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.004.
  127. Roberts, M. N., Wallace, M. A., Tomilov, A. A., Zhou, Z., Marcotte, G. R., et al. (2017) A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice, *Cell Metab.*, **26**, 539-546, doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.005.
  128. Caprio, M., Infante, M., Moriconi, E., Armani, A., Fabbri, A., et al. (2019) Very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) in the management of metabolic diseases: systematic review and consensus statement from the Italian Society of Endocrinology (SIE), *J. Endocrinol. Invest.*, **42**, 1365-1386, doi: 10.1007/s40618-019-01061-2.
  129. Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S., and Sabatini, D. M. (2010) mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing, *Nature*, **468**, 1100-1104, doi: 10.1038/nature09584.
  130. Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H. J., and Scherbaum, W. A. (2004) Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans, *Physiol. Behav.*, **83**, 47-54, doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.022.
  131. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease, *Endocr. Rev.*, **30**, 586-623, doi: 10.1210/er.2008-0047.
  132. Kim, B., McLean, L. L., Philip, S. S., and Feldman, E. L. (2011) Hyperinsulinemia induces insulin resistance in dorsal root ganglion neurons, *Endocrinology*, **152**, 3638-3647, doi: 10.1210/en.2011-0029.
  133. Cheah, Y. S., Lee, S., Ashoor, G., Nathan, Y., Reed, L. J., et al. (2014) Ageing diminishes the modulation of human brain responses to visual food cues by meal ingestion, *Int. J. Obes.*, **38**, 1186-1192, doi: 10.1038/ijo.2013.237.
  134. Xu, Q. G., Li, X. Q., Kotecha, S. A., Cheng, C., Sun, H. S., and Zochodne, D. W. (2004) Insulin as an *in vivo* growth factor, *Exp. Neurol.*, **188**, 43-51, doi: 10.1016/j.expneurol.2004.03.008.
  135. Marks, J. L., Porte Jr, D., Stahl, W. L., and Baskin, D. G. (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by *in situ* hybridization, *Endocrinology*, **127**, 3234-3236, doi: 10.1210/endo-127-6-3234.
  136. Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., et al. (1999) Brain insulin receptors and spatial memory: correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats, *J. Biol. Chem.*, **274**, 34893-34902, doi: 10.1074/jbc.274.49.34893.
  137. van der Heide, L. P., Ramakers, G. M., and Smidt, M. P. (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive, *Prog. Neurobiol.*, **79**, 205-221, doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.06.003.
  138. Abbott, M. A., Wells, D. G., and Fallon, J. R. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses, *J. Neurosci.*, **19**, 7300-7308, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07300.
  139. Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H. G., Engelsberger, S., Humrich, J., et al. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease, *J. Neural Transm.*, **105**, 423-438, doi: 10.1007/s007020050068.
  140. Gladden, L. B. (2004) Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium, *J. Physiol.*, **558**, 5-30, doi: 10.1113/jphysiol.2003.058701.
  141. Morgunova, G. V. (2020) Chinese hamster cells in biotechnological and gerontological research, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **75**, 199-205, doi: 10.3103/S0096392520040069.
  142. Apelt, J., Mehlhorn, G., and Schliebs, R. (1999) Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain, *J. Neurosci. Res.*, **57**, 693-705.

143. Rhea, E. M., and Banks, W. A. (2019) Role of the blood-brain barrier in central nervous system insulin resistance, *Front. Neurosci.*, **13**, 521, doi: 10.3389/fnins.2019.00521.
144. Lipton, J. O., and Sahin, M. (2014) The neurology of mTOR, *Neuron*, **84**, 275-291, doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.034.
145. Ramamurthy, S., and Ronnett, G. V. (2006) Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain, *J. Physiol.*, **574**, 85-93, doi: 10.1113/jphysiol.2006.110122.
146. Liu, Y. J., and Chern, Y. (2015) AMPK-mediated regulation of neuronal metabolism and function in brain diseases, *J. Neurogenet.*, **29**, 50-58, doi: 10.3109/01677063.2015.1067203.
147. Chen, M., Huang, N., Liu, J., Huang, J., Shi, J., and Jin, F. (2020) AMPK: a bridge between diabetes mellitus and Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.*, **400**, 113043, doi: 10.1016/j.bbr.2020.113043.
148. Strasser, B., Volaklis, K., Fuchs, D., and Bartscher, M. (2018) Role of dietary protein and muscular fitness on longevity and aging, *Aging Dis.*, **9**, 119-132, doi: 10.14336/AD.2017.0202.
149. Strasser, B., Berger, K., and Fuchs, D. (2014) Effects of a caloric restriction weight loss diet on tryptophan metabolism and inflammatory biomarkers in overweight adults, *Eur. J. Nutr.*, **54**, 101-107, doi: 10.1007/s00394-014-0690-3.
150. Morterá, P., and Herculano-Houzel, S. (2012) Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence, *Front. Neuroanat.*, **6**, 45, doi: 10.3389/fnana.2012.00045.
151. Kawamura, Y., Okazaki, H., O'Brien, P. C., and Dyck, P. J. (1977) Lumbar motoneurons of man: I) number and diameter histogram of alpha and gamma axons of ventral root, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **36**, 853-860, doi: 10.1097/00005072-197709000-00009.
152. Mittal, K. R., and Logmani, F. H. (1987) Age-related reduction in 8th cervical ventral nerve root myelinated fiber diameters and numbers in man, *J. Gerontol.*, **42**, 8-10, doi: 10.1093/geronj/42.1.8.
153. Tomlinson, B. E., and Irving, D. (1977) The numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord throughout life, *J. Neurol. Sci.*, **34**, 213-219, doi: 10.1016/0022-510X(77)90069-7.
154. Park, J. J., Tang, Y., Lopez, I., and Ishiyama, A. (2001) Age-related change in the number of neurons in the human vestibular ganglion, *J. Comp. Neurol.*, **431**, 437-443, doi: 10.1002/1096-9861(20010319)431:4<437::AID-CNE1081>3.0.CO;2-P.
155. Allen, D., Ribeiro, L., Arshad, Q., and Seemungal, B. M. (2017) Age-related vestibular loss: current understanding and future research directions, *Front. Neurol.*, **7**, 231, doi: 10.3389/fneur.2016.00231.
156. West, M. J. (1993) Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus, *Neurobiol. Aging*, **14**, 287-293, doi: 10.1016/0197-4580(93)90113-P.
157. Devaney, K. O., and Johnson, H. A. (1980) Neuron loss in the aging visual cortex of man, *J. Gerontol.*, **35**, 836-841, doi: 10.1093/geronj/35.6.836.
158. Pakkenberg, B., and Gundersen, H. J. G. (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age, *J. Comp. Neurol.*, **384**, 312-320.
159. Mu, Q., Xie, J., Wen, Z., Weng, Y., and Shuyun, Z. (1999) A quantitative MR study of the hippocampal formation, the amygdala, and the temporal horn of the lateral ventricle in healthy subjects 40 to 90 years of age, *Am. J. Neuroradiol.*, **20**, 207-211.
160. Sullivan, E. V., Rosenbloom, M., Serventi, K. L., and Pfefferbaum, A. (2004) Effects of age and sex on volumes of the thalamus, pons, and cortex, *Neurobiol. Aging*, **25**, 185-192, doi: 10.1016/S0197-4580(03)00044-7.
161. Peters, A., Rosene, D. L., Moss, M. B., Kemper, T. L., Abraham, C. R., et al. (1996) Neurobiological bases of age-related cognitive decline in the rhesus monkey, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55**, 861-874, doi: 10.1097/00005072-199608000-00001.
162. Merrill, D. A., Roberts, J. A., and Tuszynski, M. H. (2000) Conservation of neuron number and size in entorhinal cortex layers II, III, and V/VI of aged primates, *J. Comp. Neurol.*, **422**, 396-401, doi: 10.1002/1096-9861(20000703)422:3<396::AID-CNE6>3.0.CO;2-R.
163. Scheff, S. W., Price, D. A., and Sparks, D. L. (2001) Quantitative assessment of possible age-related change in synaptic numbers in the human frontal cortex, *Neurobiol. Aging*, **22**, 355-365, doi: 10.1016/S0197-4580(01)00222-6.
164. Freeman, S. H., Kandel, R., Cruz, L., Rozkalne, A., Newell, K., et al. (2008) Preservation of neuronal number despite age-related cortical brain atrophy in elderly subjects without Alzheimer's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **67**, 1205-1212, doi: 10.1097/NEN.0b013e31818fc72f.
165. Pakkenberg, B., Pelvig, D., Marner, L., Bundgaard, M. J., Gundersen, H. J. G., et al. (2003) Aging and the human neocortex, *Exp. Gerontol.*, **38**, 95-99, doi: 10.1016/S0531-5565(02)00151-1.
166. Zhang, C., Hua, T., Zhu, Z., and Luo, X. (2006) Age-related changes of structures in cerebellar cortex of cat, *J. Biosci.*, **31**, 55-60.
167. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
168. Von Zglinicki, T., Wan, T., and Miwa, S. (2021) Senescence in post-mitotic cells: a driver of aging? *Antioxid. Redox Signal.*, **34**, 308-323, doi: 10.1089/ars.2020.8048.
169. Campisi, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer, *Annu. Rev. Physiol.*, **75**, 685-705, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.
170. Longo, V. D., and Fabrizio, P. (2011) In *Aging Research in Yeast* (Breitenbach, M., Jazwinski, S., Laun, P., eds) Springer, Dordrecht, pp. 101-121.
171. Khokhlov, A. N., Klebanov, A. A., and Morgunova, G. V. (2018) On choosing control objects in experimental gerontological research, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **73**, 59-62, doi: 10.3103/S0096392518020049.
172. Morgunova, G. V., and Klebanov, A. A. (2018) Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **73**, 124-129, doi: 10.3103/S0096392518030136.
173. Morgunova, G. V., Karmushakov, A. F., Klebanov, A. A., and Khokhlov, A. N. (2019) Studies into the effect of "mild" uncoupling with 2, 4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **74**, 163-169, doi: 10.3103/S0096392519030088.
174. Morgunova, G. V., Klebanov, A. A., and Khokhlov, A. N. (2016) Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 207-211, doi: 10.3103/S0096392516040088.
175. Moreno-García, A., Kun, A., Calero, O., Medina, M., and Calero, M. (2018) An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration, *Front. Neurosci.*, **12**, 464, doi: 10.3389/fnins.2018.00464.
176. Jeon, Y. K., Shin, M. J., Saini, S. K., Custodero, C., Aggarwal, M., et al. (2020) Vascular dysfunction as a potential culprit of sarcopenia, *Exp. Gerontol.*, **145**, 111220, doi: 10.1016/j.exger.2020.111220.

177. De la Torre, J. C. (2012) Cerebral hemodynamics and vascular risk factors: setting the stage for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **32**, 553-567, doi: 10.3233/JAD-2012-120793.
178. Proctor, D. N., and Parker, B. A. (2006) Vasodilation and vascular control in contracting muscle of the aging human, *Microcirculation*, **13**, 315-327.

## EFFECT OF CALORIE RESTRICTION ON AGING: THE CORRECTION OF PROBLEMS WITH NUTRIENT SENSORS IN POSTMITOTIC CELLS?

### Review

G. V. Morgunova\*, G. A. Shilovsky, and A. N. Khokhlov

*School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

In the review, the role of metabolic disorders (in particular, insulin resistance) in the development of age-related diseases and in “normal” aging with an emphasis on changes in postmitotic cells of higher organisms is considered. Calorie restriction helps to prevent such metabolic disturbances, which could probably explain its ability to prolong the life of laboratory animals. Maintaining metabolic homeostasis is especially important for highly differentiated long-lived cells of the body, whose life span is comparable to life span of the whole organism. Normal functioning of these cells can be ensured only if their cytoplasm cleaning system works correctly, as well as all necessary nutrients and energy sources are available. One of the central problems in gerontology is the disruption of glucose metabolism with age, leading to related pathologies — obesity, diabetes, metabolic syndrome, etc. Skeletal muscles, along with adipose tissue, are the main consumers of insulin, so physical activity of the muscles, which supports their energy metabolism, helps to delay the onset of insulin resistance. After arising it disrupts, in particular, the metabolism of cardiomyocytes, which are surrounded with nutrient-rich environments, but do not use them to perform their functions. This contributes to the occurrence of age-related cardiovascular diseases. Metabolic pathologies also alter the nutrient sensitivity of neurons, thereby impairing the action of insulin in the central nervous system. In addition, there is evidence that insulin resistance can also develop in neurons themselves. It is assumed that the impact on nutritional sensors (e.g., AMPK) in postmitotic cells can positively affect the multicellular organism, slowing its aging and increasing life span.

**Keywords:** calorie restriction, metabolism, AMPK, autophagy, cardiomyocytes, myocytes, neurons

УДК 577.2

## СВЯЗЫВАНИЕ РНК *in vitro* СЕРПИНАМИ РАСТЕНИЙ

© 2021 Е.А. Толстыко<sup>1,2</sup>, Д.А. Чергинцев<sup>3</sup>, О.А. Толичева<sup>2</sup>, Д.С. Виноградова<sup>2,4</sup>,  
А.Л. Коневега<sup>2,5,6</sup>, С.Ю. Морозов<sup>1,7</sup>, А.Г. Соловьев<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, кафедра вирусологии, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300 Гатчина, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, кафедра физиологии растений, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> «НаноТемпер Технолоджис рус», 191167 Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет имени Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

<sup>7</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119992 Москва, Россия; электронная почта: solovyev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 12.04.2021

После доработки 09.07.2021

Принята к публикации 09.07.2021

Серпины являются ингибиторами протеиназ, выполняющими регуляторные функции; они составляют обширное семейство белков и обнаружены у всех живых организмов. Большинство серпинов растений функционально не охарактеризовано. Исключение составляет белок AtSerpin1 *Arabidopsis thaliana*, для которого показано ингибирование проапоптотических протеиназ и предполагается участие в регулировании индукции программируемой клеточной смерти, и белок CmPS1 *Cucurbita maxima*, локализованный во флоэме и предположительно ингибирующий пищеварительные протеиназы насекомых. Помимо этого, недавно было обнаружено, что белок CmPS1 способен связывать РНК, наиболее эффективно взаимодействуя с высокоструктурированными РНК, в частности формируя специфический комплекс с тРНК. В настоящей работе продемонстрировано, что белок AtSerpin1 также способен образовывать комплекс с тРНК. Анализ тРНК, связанных белками AtSerpin1 и CmPS1 в условиях избытка тРНК, показал, что ни один из белков не проявляет строгой избирательности в связывании индивидуальных тРНК, что указывает, вероятно, на специфическое взаимодействие этих белков с элементами вторичной/третичной структуры, универсальными для всех тРНК. При анализе взаимодействия белка CmPS1 с предшественником микроРНК 390 (pre-miR390) было обнаружено, что мутантный вариант pre-miR390, стебель шпильчатой структуры которого представлял собой совершенный дуплекс, утрачивал способность формировать дискретный комплекс с CmPS1, тогда как другой вариант pre-miR390, содержащий природные неспаренные нуклеотидные остатки, такой способностью обладал. Эти данные указывают на то, что специфическое взаимодействие серпинов растений со структурированными РНК основано на узнавании структурно-уникальных пространственных мотивов, формируемых с участием неспаренных нуклеотидных остатков в дуплексах РНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** серпин, связывание РНК, РНК-связывающий белок, тРНК, микроРНК, структура РНК, флоэма.

DOI: 10.31857/S0320972521100109

## ВВЕДЕНИЕ

Серпины составляют многочисленное семейство белков-ингибиторов протеиназ; они имеют характерную консервативную третичную структуру и обнаружены у всех живых организ-

мов [1, 2]. Большинство белков семейства серпинов является ингибиторами сериновых протеиназ, что и дало им название (serine protease inhibitor, serpin). Тем не менее среди серпинов обнаружены белки, ингибирующие и другие виды протеиназ [3–5], а также неингибирующие

Принятые сокращения: AtMC1 – *A. thaliana* metacaspase 1 (метакаспаса 1 резуховидки Таля); AtMC9 – *A. thaliana* metacaspase 9 (метакаспаса 9 резуховидки Таля); AtSerpin1 – *A. thaliana* serpin 1 (серпин 1 резуховидки Таля); CmPS1 – *Cucurbita maxima* phloem serpin 1 (флоэмный серпин 1 тыквы гигантской); PSTVd – potato spindle tuber viroid (вириод веретеновидности клубней картофеля); RCL – reactive center loop (ингибиторная петля); TCTP – translationally controlled tumor protein (трансляционно контролируемый опухолевый белок).

\* Адресат для корреспонденции.

серпины [6–9], причисленные к данному семейству на основании характерной структуры белковой молекулы.

Структура молекулы типичного серпина формируется приблизительно 350–400 аминокислотными остатками и обычно включает три  $\beta$ -слоя и 8–9  $\alpha$ -спиралей, окружающих центральный  $\beta$ -слой (т.н.  $\beta$ -слой А), состоящий из пяти  $\beta$ -тяжей. Сразу же за одним из двух центральных тяжей  $\beta$ -слоя А расположен неструктурированный участок полипептидной цепи, находящийся на поверхности молекулы серпина и носящий название «ингибиторная петля» (reactive center loop, RCL). Часть RCL служит «наживкой», узнаваемой протеиназой, ингибируемой данным серпином, как субстрат для протеолиза [10–12]. Ингибиторный механизм серпина основан на резком изменении его конформации, происходящем на промежуточной стадии протеолиза RCL протеиназой, которая, в силу особенностей механизма катализа, в этот момент ковалентно связана с RCL. При конформационном переходе серпина ингибиторная петля втягивается в пространство между двумя центральными тяжями  $\beta$ -слоя А и образует дополнительный  $\beta$ -тяж в его составе, при этом протеиназа теряет ферментативную активность в результате нарушения ее пространственной структуры и оказывается неспособной завершить расщепление ингибиторной петли [1, 12, 13]. Таким образом, при ингибировании протеиназы серпином происходит образование ковалентной связи между одной молекулой протеиназы и одной молекулой серпина, которое приводит к инактивации данной молекулы протеиназы и является необратимым [2, 14].

Помимо собственно ингибирования протеиназ, известны и другие функции, выполняемые серпинами, среди них – перенос гормонов [6, 7], участие в фолдинге белков [8], накопление аминокислот [9]. Отдельно стоит упомянуть ингибитор ядерной протеазы MENT (myeloid and erythroid nuclear termination stage-specific protein), который способствует конденсации хроматина в терминально дифференцированных клетках птиц [15, 16], а также ингибитор лейкоцитарной эластазы (LEI), в определенных условиях приобретающий активность ДНКазы II и участвующий во фрагментации хроматина в процессе апоптоза [17, 18]. До недавнего времени лишь для этих двух серпинов была показана способность к взаимодействию с нуклеиновыми кислотами.

Анализ геномов нескольких десятков растений показал, что гены серпинов составляют небольшие мультигенные семейства, включающие 5–10 генов [19]. Сравнительный анализ первич-

ной структуры серпинов разных видов растений показал, что эти белки образуют несколько обособленных и достаточно удаленных друг от друга кластеров, соответствующих порядкам царства растений, что, как полагают, может свидетельствовать о давней дивергенции этих белков, происходившей после эволюционного расхождения порядков, а также их функциональной специализации в отдаленных группах растений [19]. Исключение составляют серпины так называемой LR-группы, названные по наличию инвариантных остатков лейцина (L) и аргинина (R) в последовательности RCL и обнаруженные у всех растений, включая одноклеточные и колониальные зеленые водоросли. Предполагают, что серпины LR-группы в силу консервативности первичной структуры могут выполнять сходные функции у эволюционно удаленных растений [19].

Серпины растений способны ингибировать протеиназы семейства химотрипсина, которые являются наиболее распространенными мишенями серпинов животных [1, 20]. Вместе с тем, поскольку геномы растений не кодируют протеиназы такого типа, выявление функций серпинов растений не может основываться на сходстве их последовательностей с белками других организмов и требует экспериментальной работы. В настоящее время с функциональной точки зрения охарактеризовано лишь несколько серпинов растений.

Для белка *Serpin1 Arabidopsis thaliana* (AtSerpin1), относящегося к LR-группе, обнаружено три растительных протеиназы-мишени. Во-первых, AtSerpin1 способен образовывать ковалентные комплексы с папаин-подобной протеиназой RD21 (responsive to desiccation 21), которая локализуется в вакуоли [21]. Поскольку известно, что высвобождение вакуолярных протеиназ в цитоплазму в результате нарушения целостности тонопласта вызывает клеточную смерть при развитии гиперчувствительного ответа у растений, была предложена модель, согласно которой локализованный в цитоплазме AtSerpin1 контролирует активность протеиназы RD21 при ее высвобождении в цитоплазму и таким образом модулирует индукцию клеточной смерти [21]. В подтверждение этой модели показано, что сверхэкспрессия белка AtSerpin1 в определенных условиях способна подавлять развитие клеточной смерти [22]. Во-вторых, AtSerpin1 образует комплекс с протеиназой AtMC1 (*Arabidopsis thaliana* metacaspase 1), относящейся к метакаспазам растений, отдаленно родственным каспазам животных, и ингибирует развитие клеточной смерти, индуцированное AtMC1 [23]. В-третьих, AtSerpin1 способен взаимодей-

вать с еще одной метакаспазой, AtMC9, однако функциональное значение ингибирования активности AtMC9 белком AtSerp1 *in vivo* остается неизвестным [24]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют об участии белка AtSerp1 в процессах, связанных с регулированием индукции программируемой клеточной смерти.

Для флоэмного серпина тыквы (*Cucurbita maxima* phloem serpin 1, CmPS1), также относящегося к LR-группе, природная протеиназа-мишень неизвестна, однако показано, что он способен ингибировать эластазу – фермент млекопитающих, относящийся к сериновым протеиназам [25]. Было обнаружено, что повышение уровня CmPS1 коррелирует со снижением способности тлей питаться и размножаться на растениях, что дало основание предполагать защитную роль CmPS1, которая может быть связана с ингибированием пищеварительных протеиназ насекомых. Тем не менее в прямом эксперименте добавление рекомбинантного белка CmPS1 к корму тлей не имело какого-либо эффекта на их выживание [25]. С другой стороны, питание с добавлением рекомбинантного белка AtSerp1 приводило к замедлению роста и повышению смертности личинок тлей и египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis* [26]. Наличие защитной функции, заключающейся в ингибировании пищеварительных протеаз насекомых, предполагается также у серпинов, которые в существенных количествах накапливаются в зернах злаковых [27].

Недавно мы продемонстрировали способность CmPS1 к связыванию РНК. При этом в условиях *in vitro* данный белок наиболее эффективно взаимодействует с высокоструктурированными РНК, в частности формируя специфический комплекс с тРНК [28]. С учетом того, что тРНК и тРНК-подобные структуры, как полагают, содержат сигналы, направляющие транспорт молекул РНК по флоэме [29], а также способности ортолога CmPS1 из огурца (*Cucumis sativus*) к дальнему (системному) транспорту по флоэме [30], была предложена гипотеза, согласно которой белок CmPS1 обладает не связанными с ингибированием протеиназ дополнительными регуляторными функциями, которые могут заключаться в участии в системном сигналинге, основанном на флоэмном транспорте РНК [31].

В настоящей статье продемонстрирована способность белка AtSerp1 связывать РНК, показано его эффективное взаимодействие с тРНК, а также представлены результаты исследования специфичности связывания тРНК белками AtSerp1 и CmPS1 и взаимодействия

белка CmPS1 с предшественником микроРНК. Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии серпинов с элементами третичной структуры молекул РНК, такими как пространственные мотивы в несовершенных дуплексах РНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Генетические конструкции.** Конструкции pET33b(+)[CmPS1] для экспрессии белка CmPS1 в бактериальных клетках и pBSCII-SK(+)-miR390 для получения *in vitro* T7-транскрипта pre-miR390 описаны ранее [28, 32]. Для получения конструкции pET33b(+)[AtSerp1] кодирующую последовательность белка AtSerp1 амплифицировали с использованием праймеров 5'-GGCCATGGACGTGCGTGAATCAATCTC и 5'-CGCTCGAGATGCAACGGATCAACAACCTTGG на матрице кДНК *A. thaliana*. Полученный продукт амплификации расщепляли эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XhoI* и лигировали с аналогичным образом разрезанным вектором pET33b(+). Для получения мутантных вариантов pre-miR390, Loop и 5M, проводили амплификацию на матрице pBSCII-SK(+)-miR390 с использованием праймера 5'-GCGGTACCGAGAAATAGCTATAAGCTCAGGAG в комбинации либо с праймером 5'-TCGGATCCAAGAAGAAGCTATGGAATCAGGATGGATAGCGCCAAGCCATGGCGCTATCCCTC, либо с праймером 5'-TCGGAATCCAAGAAATAGCTATAAAACCTCAGGAGGGATAGCG соответственно. Полученные продукты разрезали с использованием рестриктаз *KpnI* и *BamHI* и лигировали с аналогичным образом разрезанным вектором pBSCII-SK(+). Для получения двойного мутанта последнюю пару праймеров использовали для амплификации на матрице мутантной конструкции pBSCII-SK(+)-miR390-Loop.

**Получение рекомбинантных белков.** Для наработки рекомбинантных белков CmPS1 и AtSerp1 использовали конструкции pET33b(+)[CmPS1] и pET33b(+)[AtSerp1], которыми трансформировали клетки *E. coli* штамма BL-21(DE3). Полученные клоны-продуценты выращивали в течение ночи при 37 °C в среде 2YT, содержащей канамицин, при качании на скорости 180 об./мин. Затем 30 мл ночной культуры использовали для инокуляции 370 мл свежей среды 2YT с канамицином. После инкубации культуры в течение 1 ч при 37 °C при качании на скорости 180 об./мин индуцировали экспрессию рекомбинантных белков добавлением IPTG до конечной концентрации 1 mM. Культуры инку-

бирова́ли в течение 3 ч в тех же условиях, затем собирали клетки центрифугированием при 4500 g в течение 10 мин и ресуспендировали в 10 мл буфера А (6 М гуанидина гидрохлорид, 100 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) с добавлением PMSF до конечной концентрации 5 мМ, после чего инкубировали в течение часа при комнатной температуре и качании. Далее лизат центрифугировали в течение 10 мин при 20 200 g с отбором супернатанта в хроматографическую колонку с Ni-NTA агарозой «Protino» («Macherey-Nagel», Германия). Для связывания белков с Ni-NTA агарозой колонку в течение часа инкубировали при комнатной температуре с умеренным перемешиванием. Далее колонку промывали, последовательно добавляя по 10 мл буфера А, буфера В (8 М мочеви́на, 100 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и буфера С (8 М мочеви́на, 100 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ Tris-HCl, pH 6,3). Затем связанные белки элюировали буфером Е (8 М мочеви́на, 100 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ Tris-HCl, pH 4,5) и ренатурировали путем диализа с использованием диализных мешков SERVAPOR® (MWCO 12000–14000, диаметр 50 мм; «SERVA», Германия) против высокоочищенной воды в случае CmPS1, либо против буфера (200 мкМ Tris-HCl, pH 7,5) – в случае диализа AtSerp1n1.

**РНК-субстраты для связывания с белком.** Для экспериментов по связыванию тРНК с белком использовали коммерческий препарат дрожжевой тРНК («Sigma», США), а также обогащенную тРНК фракцию растительных РНК [28]. Для ее получения с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) из листовой ткани растения был выделен препарат тотальной РНК. Далее к нему был добавлен хлорид лития до конечной концентрации 2 М. Смесь инкубировали в течение ночи при 4 °С с последующим центрифугированием при 20 000 g в течение 15 мин при 4 °С для осаждения фракции длинных РНК. После этого к супернатанту был добавлен этанол для последующего осаждения центрифугированием обогащенной тРНК фракции, как было описано ранее [28]. Остальные РНК-субстраты были получены путем транскрипции *in vitro* с T7 РНК-полимеразой («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Транскрипты РНК ТСТР (translationally controlled tumor protein) и PSTVd (potato spindle tuber viroid) были получены на матрице ранее описанных конструкций pBSCII-SK(+)-ТСТР [28] и pBSCII-SK(+)-PSTV [33], предварительно линеаризованных по сайту *Xba*I. Транскрипты pre-miR390 и двух ее мутантных вариантов (pre-miR390 Loop, pre-miR390 5M) были получены на матрицах соответствующих конст-рук-

ций, предварительно линеаризованных по сайту *Bam*HI. Транскрипт pre-miR390 5M-Loop был получен с использованием продукта амплификации двойного мутанта в качестве матрицы. После завершения транскрипции РНК-субстраты были очищены из реакционной смеси с помощью экстракции смесью фенол/хлороформ и осаждения этанолом.

**Анализ РНК-связывающих свойств белков методом сдвига в агарозном геле.** Для связывания к РНК-субстратам добавляли соответствующие различным молярным соотношениям рассчитанные количества белка, после чего инкубировали в течение 20 мин на ледяной бане в буфере для связывания (50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 5% глицерин, 10 мМ HEPES-HCl, pH 8,0). Концентрация РНК в смеси для связывания имела следующие значения: тРНК – 171 нМ; PSTVd – 43 нМ; pre-miR390-wt (дикий тип) и pre-miR390-5M – 105 нМ; pre-miR390-Loop и pre-miR390-5M-Loop – 148 нМ; ТСТР – 66 нМ. После инкубации образцы наносили на 1,5%-ный агарозный гель, содержащий бромистый этидий, для электрофореза. Результаты фиксировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США).

**Микротермофорез.** Анализ взаимодействия тРНК с белком проводили в экспериментах титрования методом микротермофореза [34, 35]. Комплексы формировали при постоянной концентрации 0,5 мкМ инициаторной  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$ , несущей флуоресцентную метку Bodipy FL («Thermo Fisher Scientific») на  $\alpha$ -аминогруппе метионина, при концентрации белка, изменяющейся от 0,0195 до 20 мкМ. Анализ проводили в буферном растворе (50 мМ NaCl, 5% глицерин, 10 мМ HEPES-HCl, pH 8,0). После смешивания образцы инкубировали в течение 20 мин при температуре 0 °С, после чего центрифугировали при 11 000 об./мин в течение минуты. Анализ изменения флуоресценции проводили с помощью прибора Monolith NT.115 с использованием стандартных капилляров MO-K022 («NanoTemper Technologies», Германия). Интенсивность излучения ИК-лазера составляла 40%. Аппроксимация данных, полученных методом термофореза, проводилась для трех измерений.

**Анализ селективности связывания тРНК белком.** Для исследования селективности связывания белка с тРНК была приготовлена смесь, содержащая РНК и белок в молярном соотношении 1 : 10 в буфере для связывания (50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 5% глицерин, 10 мМ HEPES-HCl, pH 8,0). После инкубации в течение 20 мин на ледяной бане смесь была нанесена на агарозный гель для проведения электрофореза. Затем фрагмент геля, содержащий комплексы тРНК с

белком, вырезали, помещали в спин-колонку с фильтром Mini Bio-Spin («Bio-Rad») и центрифугировали при 6000 g в течение 4 мин. Пропущенная через колонку жидкость была использована для выделения РНК с помощью экстракции смесью фенол/хлороформ и осаждения этанолом. После определения концентрации с помощью бескуветного спектрофотометра Nanodrop 2000 («Thermo Scientific») образцы РНК секвенировали методом высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS; ООО «Геноаналитика», Россия) параллельно с эквивалентным количеством исходных препаратов тРНК. Контроль качества секвенирования проводили с помощью программы FastQC [36]. Для анализа селективности связывания тРНК белком AtSerp1n1 чтения были выровнены на последовательности тРНК *A. thaliana* из базы данных tRNAdb [37] с помощью алгоритма Bowtie2 [38, 39], а также на геном *A. thaliana* (идентификатор RefSeq: GCF\_000001735.4) с помощью HISAT2 [40]. Для анализа селективности связывания тРНК белком CmPS1 чтения были выровнены на геном *C. maxima* (идентификатор RefSeq: GCF\_002738345.1) с помощью программы STAR [41]. Подсчет количества выровненных чтений проводили с помощью алгоритма HTSeq [42].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Способность белка AtSerp1n1 к связыванию РНК.** Способность связывать РНК была показана для белка CmPS1 [28], но не изучалась для других серпинов растений, и оставалось неясным, является ли это свойство уникальной особенностью CmPS1. В настоящей работе проводился анализ РНК-связывающих свойств белка *A. thaliana* AtSerp1n1, относящегося, как и белок CmPS1, к LR-группе серпинов. Кодированная последовательность белка AtSerp1n1 была амплифицирована на матрице кДНК *A. thaliana* и клонирована в составе вектора pET33b(+). Рекомбинантный AtSerp1n1, слитый с последовательностью из шести гистидиловых остатков, был экспрессирован в клетках *E. coli*, аффинно очищен на Ni-NTA агарозе и ренатурирован. Анализ РНК-связывающих свойств полученного белка проводили методом сдвига в геле. В этих экспериментах РНК инкубировали с увеличивающимися количествами белка и затем анализировали в агарозном геле. В качестве контроля использовали аналогичным образом полученный препарат рекомбинантного белка CmPS1. Как и в ранее описанных эксперимен-

тах [28], при связывании тРНК белок CmPS1 давал три типа комплексов, а именно: комплексы, неспособные входить в гель; движущиеся в геле комплексы, подвижность которых уменьшалась с увеличением соотношения белок : РНК; и специфический комплекс CmPS1–тРНК, видимый в геле как дискретная полоса (рис. 1). Комплексы двух первых типов возникают, как предполагается, ввиду наличия у белка CmPS1 способности к неспецифическому связыванию высокоструктурированных РНК, проявляющейся в образовании подобного рода комплексов с такими РНК, как РНК трансляционно контролируемого опухолевого белка ТСТР и вириона веретеновидности клубней картофеля PSTVd, которые имеют выраженную вторичную структуру и могут рассматриваться как несовершенные дуплексы РНК [28]. При связывании белка AtSerp1n1 с тРНК формировался дискретный комплекс, сходный с тем, который наблюдается в случае CmPS1, однако образующийся при несколько большем соотношении белок : РНК. При этом не способные входить в гель комплексы в случае белка AtSerp1n1 не наблюдались (рис. 1). Еще одно существенное отличие в характере связывания тРНК белками AtSerp1n1 и CmPS1 проявлялось в переходе РНК из состава специфических комплексов в состав неспецифических при увеличении соотношения белок : РНК в случае CmPS1 и отсутствие такого перехода в случае белка AtSerp1n1 (рис. 1). Эти наблюдения указывают на то, что способность AtSerp1n1 к неспецифическому связыванию РНК значительно ниже таковой белка CmPS1. Для проверки этого вывода было проведено связывание белком AtSerp1n1 РНК ТСТР и PSTVd, которые, как было показано ранее, образуют с белком CmPS1 комплексы за счет неспецифической РНК-связывающей активности белка CmPS1 [28]. В экспериментах по сдвигу в геле комплексы этих РНК с белком AtSerp1n1 практически не обнаруживались (рис. 1). Таким образом, можно заключить, что белок AtSerp1n1, как и CmPS1, способен связывать тРНК, но обладает сравнительно низкой неспецифической РНК-связывающей активностью.

**Оценка аффинности AtSerp1n1 к тРНК.** Количественную оценку связывания тРНК с белком AtSerp1n1 проводили при помощи микротермофореза, где в качестве репортера выступала молекула инициаторной Вру-Met-tRNA<sup>Met</sup> [34, 35]. В условиях увеличивающейся концентрации белка подвижность флуоресцентно-меченой тРНК изменялась в результате образования комплекса. Аффинность такого взаимодействия оценивалась в микромолярном диапазоне ( $K_d = 3,9 \pm 2,9$  мкМ) (рис. 2) и была соизмерима срод-

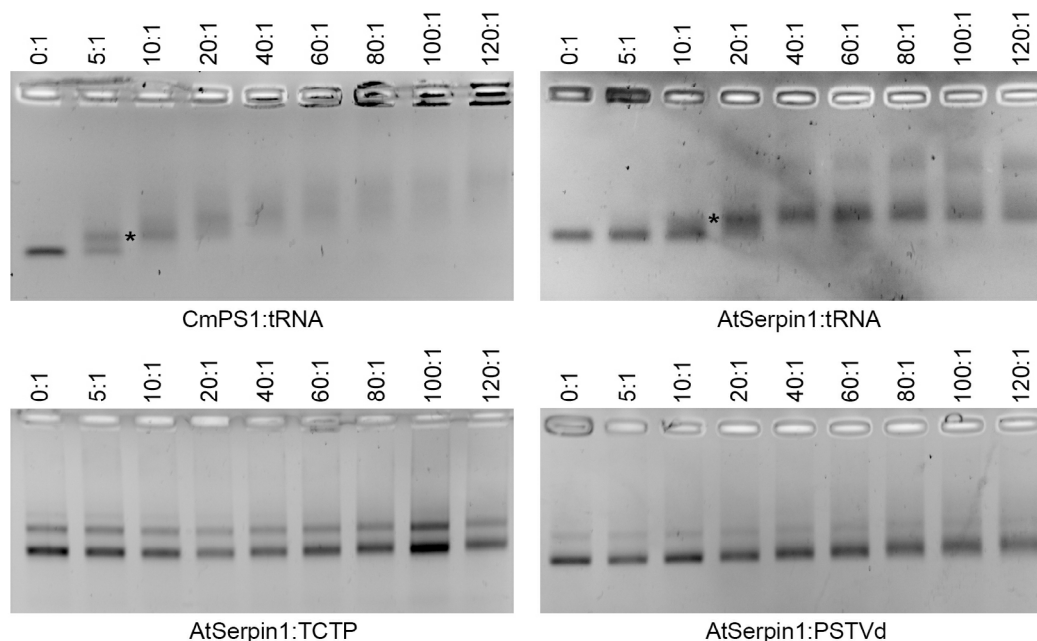


**Рис. 1.** Анализ РНК-связывающих свойств белка AtSerpin1 методом сдвига в геле. Рекombинантный белок инкубировали с РНК и наносили на агарозный гель. Приведены эксперименты по связыванию белком AtSerpin1 тРНК, РНК ТСТР и PSTVd. В качестве контроля использовали связывание тРНК белком CmPS1. Молярное соотношение белок : РНК указано над каждой дорожкой. Звездочкой обозначено положение дискретного комплекса с тРНК

ству инициаторного фактора трансляции IF2 к инициаторной Вру-Met-tRNA<sup>Met</sup> [35]. Полученное значение константы диссоциации комплекса AtSerpin1 с инициаторной Вру-Met-tRNA<sup>Met</sup> мы рассматриваем как нижнюю оценку ввиду недостаточного выхода кривой в насыщение относительно количества белка. Следует также заметить, что данные микротермофореза являются дополнительным подтверждением способности белка AtSerpin1 связывать РНК.

**Селективность связывания тРНК белком AtSerpin1.** При анализе РНК-связывающей активности AtSerpin1 методом сдвига в геле использовали препарат тотальной тРНК дрожжей, что не давало возможности оценить, способен ли данный белок предпочтительно связывать какие-либо тРНК *A. thaliana*. Для проверки наличия этой способности использовали фракцию, обогащенную тРНК, которая была выделена как описано ранее [28] из препарата тотальной РНК, полученной из листьев *A. thaliana*, и включала преимущественно тРНК, а также незначительные количества других клеточных РНК.

Для того, чтобы оценить возможность предпочтительного связывания каких-либо тРНК белком AtSerpin1, анализировали состав РНК в комплексе тРНК–AtSerpin1, полученном при соотношении белок : РНК = 10 : 1, при котором только часть РНК в инкубационной смеси пере-

ходила в состав комплекса. Полоса, соответствующая такому комплексу, была вырезана из агарозного геля и использована для выделения содержащейся в комплексе РНК, которую затем

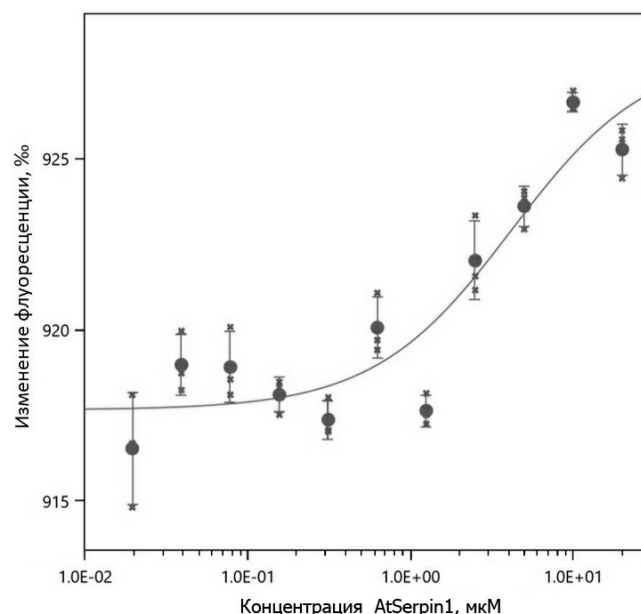


**Рис. 2.** Образование комплекса белка AtSerpin1 с Вру-Met-tRNA<sup>Met</sup>, измеренное методом микротермофореза в условиях изменяющейся концентрации белка. Показаны значения, полученные в трех экспериментах, их среднее и стандартное отклонение

подвергали высокопроизводительному секвенированию. В качестве контроля использовали РНК, инкубированную в отсутствие белка AtSerp1 и, следовательно, имеющую исходную электрофоретическую подвижность в агарозном геле. Проводили секвенирование двух независимо полученных опытных образцов и двух контрольных образцов.

После технической фильтрации данных NGS для каждого образца определяли доли чтений, соответствующих всем индивидуальным тРНК *A. thaliana*, имеющимся в базе данных тРНК данного вида (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>). Полученные данные (таблица в Приложении) подвергались фильтрации по двум параметрам. Во-первых, были отсеяны тРНК, для которых суммарное число чтений в двух опытных и двух контрольных образцах было меньше 200, что позволило исключить из рассмотрения последовательности с недостаточным для достоверного анализа покрытием. Во-вторых, были отсеяны тРНК, для которых разница в доле чтений между двумя повторностями эксперимента и/или контроля составляла более 30%, что делало

сравнение экспериментальных и контрольных данных заведомо недостоверным. Полученные данные (табл. 1) демонстрируют, что при образовании комплекса AtSerp1 с тРНК происходит изменение относительных долей тРНК в сравнении с тотальной тРНК *A. thaliana*. Для ряда тРНК наблюдалось увеличение доли в сравнении с контролем, тогда как для остальных — уменьшение этой доли. В частности, в 3,68–4,19 раза по сравнению с контролем увеличивалась доля tRNA-Gly(GCC), tRNA-Tyr(GUA) и tRNA-Ser(GCU), что может говорить об их предпочтительном связывании. Вместе с тем, все виды тРНК *A. thaliana* обнаруживались в составе комплекса с белком AtSerp1 в условиях, когда тРНК находилась в избытке и только часть молекул тРНК в инкубационной смеси переходила в состав комплекса. Эти данные говорят об отсутствии строгой избирательности связывания тРНК белком AtSerp1 и его способности связывать все виды тРНК, наблюдаемая разница в эффективности связывания которых является количественной, а не качественной. Поскольку AtSerp1 формирует комплексы с

**Таблица 1.** Анализ предпочтительности связывания тРНК *A. thaliana* белком AtSerp1 *in vitro*

| тРНК          | Идентификатор tRNAdb | Комплекс, %*    | Контроль, %*    | Отношение |
|---------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| tRNA-Gly(GCC) | tdbD00005327         | 0,05 ± 0,01     | 0,013 ± 0,002   | 4,19      |
| tRNA-Tyr(GUA) | tdbD00011652         | 0,13 ± 0,01     | 0,033 ± 0,004   | 3,90      |
| tRNA-Ser(GCU) | tdbD00009863         | 0,27 ± 0,02     | 0,07 ± 0,01     | 3,68      |
| tRNA-Ala(UGC) | tdbD00003871         | 0,016 ± 0,001   | 0,0068 ± 0,0005 | 2,35      |
| tRNA-Ser(GGA) | tdbD00009864         | 3,1 ± 0,2       | 1,40 ± 0,06     | 2,20      |
| tRNA-Ala(AGC) | tdbD00003864         | 0,042 ± 0,004   | 0,019 ± 0,002   | 2,17      |
| tRNA-Asp(GUC) | tdbD00000505         | 0,270 ± 0,005   | 0,130 ± 0,005   | 2,08      |
| tRNA-Ala(AGC) | tdbD00003866         | 0,043 ± 0,005   | 0,0205 ± 0,0002 | 2,07      |
| tRNA-Thr(AGU) | tdbD00010496         | 0,1477 ± 0,0004 | 0,07 ± 0,01     | 2,07      |
| tRNA-Gln(UUG) | tdbD00008612         | 0,0335 ± 0,0005 | 0,016 ± 0,002   | 2,05      |
| tRNA-Asp(GUC) | tdbD00004461         | 0,272 ± 0,002   | 0,135 ± 0,005   | 2,02      |
| tRNA-Asp(GUC) | tdbD00004462         | 0,261 ± 0,005   | 0,132 ± 0,005   | 1,98      |
| tRNA-Thr(AGU) | tdbD00010494         | 0,14 ± 0,01     | 0,070 ± 0,007   | 1,96      |
| tRNA-Asp(GUC) | tdbD00000504         | 0,245 ± 0,006   | 0,127 ± 0,005   | 1,93      |
| tRNA-Gly(GCC) | tdbD00005326         | 0,11 ± 0,01     | 0,065 ± 0,001   | 1,65      |
| tRNA-Thr(AGU) | tdbD00010495         | 0,052 ± 0,002   | 0,032 ± 0,002   | 1,65      |
| tRNA-Gly(GCC) | tdbD00005330         | 0,073 ± 0,002   | 0,045 ± 0,002   | 1,62      |
| tRNA-Gly(GCC) | tdbD00005329         | 0,104 ± 0,009   | 0,068 ± 0,002   | 1,53      |
| tRNA-Pro(UGG) | tdbD00008227         | 0,045 ± 0,006   | 0,031 ± 0,002   | 1,42      |
| tRNA-His(GUG) | tdbD00005721         | 6,3 ± 0,2       | 4,8 ± 0,2       | 1,33      |

Примечание. В таблице показаны 20 тРНК, имеющих наибольшее отношение эксперимент : контроль и удовлетворяющих критериям фильтрации исходных данных (см. текст). Полные результаты анализа приведены в Приложении к статье.

\* Среднее значение, полученное для двух независимых образцов.

тРНК, но не с другими протестированными РНК (рис. 1), можно заключить, что данный белок специфически связывает элементы вторичной/третичной структуры, универсальные для всех тРНК.

Этот вывод согласуется с результатами экспериментов, в которых белок AtSerp1 эффективно связывал дрожжевые тРНК, которые не являются его природными лигандами (рис. 1). Помимо этого, выравнивание первичных чтений, полученных с помощью NGS, с полной последовательностью генома *A. thaliana* показало, что часть чтений соответствует тРНК, кодируемым геномами хлоропластов и митохондрий. Согласно полученным данным, доля таких тРНК, составлявшая около 60% в исходном препарате, использованном для связывания, увеличивалась при формировании комплекса с AtSerp1 до 70% (рисунок в Приложении), что указывало на отсутствие преимущественного связывания этим белком тРНК, кодируемых ядерным геномом. С учетом того, что AtSerp1 является цитоплазматическим белком [21] и не может взаимодействовать *in vivo* с хлоропластными и митохондриальными тРНК в силу компартментализации, однако эффективно связывает их *in vitro*, как и гетерологичные дрожжевые тРНК, можно предположить, что белок AtSerp1 взаимодействует с универсальными элементами вторичной/третичной структуры тРНК.

**Селективность связывания тРНК белком CmPS1.** Для того, чтобы оценить, присущ ли характер связывания тРНК, выявленный для AtSerp1, белку CmPS1, был проведен эксперимент по анализу селективности связывания, сходный с описанным выше для AtSerp1. Рекомбинантный белок CmPS1 инкубировали с обогащенной тРНК фракцией тотального препарата РНК *C. maxima* при соотношении белок : РНК = 10 : 1, когда только часть тРНК в смеси переходила в состав комплексов, которые затем были отделены от несвязавшейся тРНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Далее полосу, соответствующую комплексу, вырезали из агарозного геля и использовали для выделения содержащейся в комплексе РНК. Полученный образец вместе с эквивалентным количеством исходного препарата обогащенной тРНК фракции секвенировали с помощью NGS. Полученные чтения выравнивали с последовательностью генома *C. maxima*. Результаты анализа данных NGS для CmPS1 (табл. 2) в целом сходны с теми, которые были получены для AtSerp1. В условиях избытка тРНК белок CmPS1 в той или иной степени связывал все тРНК. При этом тРНК в составе комплексов с

**Таблица 2.** Анализ предпочтительности связывания тРНК *C. maxima* белком CmPS1 *in vitro*

| тРНК          | Комплекс, % | Контроль, % | Отношение |
|---------------|-------------|-------------|-----------|
| tRNA-Ala(CGC) | 2,73        | 0,94        | 2,92      |
| tRNA-Cys(GCA) | 5,79        | 2,54        | 2,28      |
| tRNA-Thr(GGU) | 0,69        | 0,33        | 2,06      |
| tRNA-Leu(AAG) | 0,07        | 0,04        | 1,84      |
| tRNA-Ala(UGC) | 4,60        | 2,59        | 1,77      |
| tRNA-Ala(AGC) | 4,14        | 2,35        | 1,76      |
| tRNA-Pro(CGG) | 0,03        | 0,02        | 1,72      |
| tRNA-Ile(UAU) | 0,03        | 0,02        | 1,71      |
| tRNA-Thr(CGU) | 0,16        | 0,10        | 1,68      |
| tRNA-Ser(AGA) | 0,45        | 0,27        | 1,67      |
| tRNA-Ile(AAU) | 0,02        | 0,01        | 1,64      |
| tRNA-Leu(UAA) | 0,03        | 0,02        | 1,57      |
| tRNA-Leu(UAG) | 0,15        | 0,10        | 1,55      |
| tRNA-Val(CAC) | 0,04        | 0,03        | 1,50      |
| tRNA-Pro(UGG) | 1,04        | 0,70        | 1,48      |
| tRNA-Val(UAC) | 0,02        | 0,01        | 1,47      |
| tRNA-Leu(CAG) | 0,03        | 0,02        | 1,47      |
| tRNA-Gln(UUG) | 0,74        | 0,53        | 1,40      |
| tRNA-Asn(AUU) | 0,11        | 0,08        | 1,40      |
| tRNA-Val(AAC) | 0,12        | 0,08        | 1,39      |

Примечание. В таблице показаны 20 тРНК, имеющих наибольшее отношение эксперимент : контроль.

CmPS1, для которых наблюдалось наибольшее увеличение доли в общем количестве тРНК в сравнении с контролем (табл. 2), не соответствовали тем тРНК, для которых было выявлено наибольшее соотношение опыт : контроль в эксперименте с AtSerp1 (табл. 1). В целом, эти данные согласуются с выводом о способности белков AtSerp1 и CmPS1, относящихся к консервативной LR-группе серпинов, связывать тРНК, узнавая характерные особенности вторичной/третичной структуры, но не какую-либо специфическую нуклеотидную последовательность.

**Связывание pre-miR390 белком CmPS1.** Специфическое взаимодействие белков и молекул РНК основано на узнавании белками пространственных (3D) мотивов, которые создаются за счет неспаренных нуклеотидных остатков в дуплексах РНК, участвующих в неканонических взаимодействиях и формирующих структурно-уникальные поверхности [43, 44]. Ранее нами было высказано предположение, что связывание тРНК белком CmPS1 может быть основано на узнавании такого рода 3D-мотива [31]. В дан-

ной работе мы провели экспериментальную проверку этого предположения с использованием в качестве РНК-лиганда белка CmPS1 предшественника микроРНК 390 (pre-miR390), который представляет собой несовершенный дуплекс, способный за счет присутствия в его составе неспаренных остатков формировать 3D-мотивы (рис. 3). Связывание белка CmPS1 с полученным *in vitro* T7-транскриптом, соответствующим pre-miR390, анализировали методом сдвига в геле. Было обнаружено, что белок CmPS1 образует с pre-miR390 два типа комплексов, а именно: комплексы, неспособные войти в агарозный гель, и комплексы, мигрирующие в геле (рис. 3), сходные с комплексами, наблюдавшимися ранее при связывании CmPS1 с РНК TCTP и PSTVd, представляющими собой, как и pre-miR390, несовершенные дуплексы

РНК [28]. Далее был проведен анализ способности белка CmPS1 связывать мутантные варианты pre-miR390, в одном из которых было введено пять точечных замен, устраняющих некомплементарные нуклеотидные остатки в стебле шпильчатой структуры pre-miR390 и превращающие ее в совершенный дуплекс (мутант 5M), тогда как в другом был делетирован район, формирующий дистальную часть стебля и петлю вторичной структуры pre-miR390 (мутант Loop) (рис. 3). В эксперименте по сдвигу в геле с T7-транскриптами 5M и Loop было обнаружено, что оба мутанта сохраняют способность образовывать два типа комплексов, характерные для природной pre-miR390 (рис. 3). При этом в случае мутанта Loop было обнаружено формирование дополнительного комплекса, наблюдаемого как дискретная полоса в агарозном геле

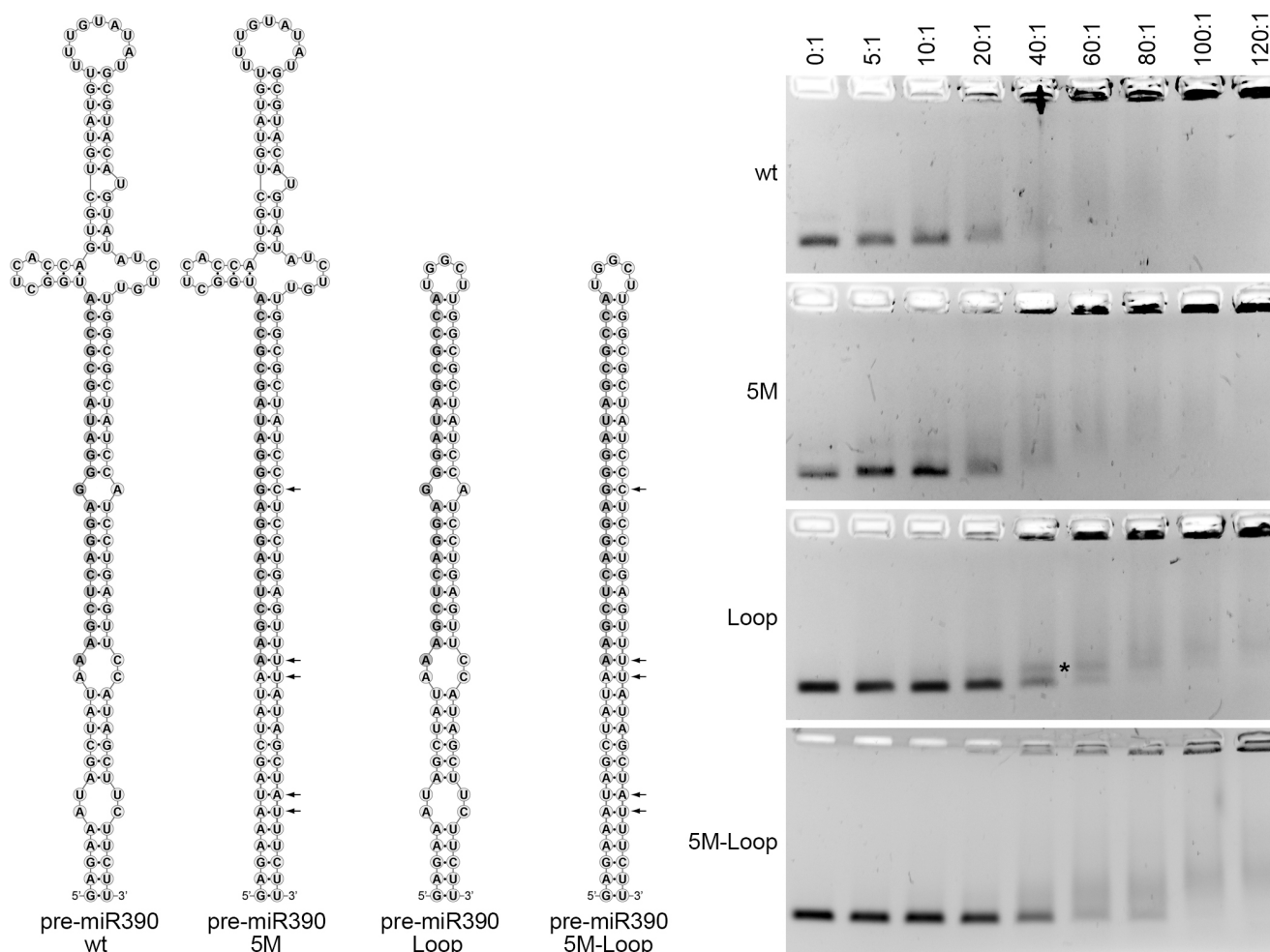


**Рис. 3.** Связывание pre-miR390 и ее мутантных вариантов белком CmPS1. Показаны модели вторичной структуры pre-miR390 дикого типа (wt) и мутантов 5M, Loop и 5M-Loop. Нуклеотидные остатки, входящие в зрелую miR390, выделены темно-серым цветом. Стрелками отмечены остатки, мутированные в конструкциях 5M и 5M-Loop. Анализ связывания РНК белком CmPS1 проводили методом сдвига в геле. Указаны молярные соотношения белок : РНК для всех РНК-субстратов. Звездочкой обозначено положение дискретного комплекса

(рис. 3) и сходного со специфическим комплексом, формируемым белком CmPS1 и тРНК. Можно предположить, что формирование такого комплекса могло быть результатом взаимодействия CmPS1 с 3D-мотивами, формируемыми некомплементарными остатками в стебле шпильчатой структуры pre-miR390. Вполне вероятно, что эти остатки маскированы в составе природной структуры за счет наличия ее дистального района, включающего петлю, и становятся доступными для взаимодействия с CmPS1 в результате делеции этого района. Для того, чтобы проверить это предположение, был сконструирован дополнительный мутант 5M-Loop, несущий обе мутации, присутствующие в конструкциях 5M и Loop (рис. 3). Связывание белка CmPS1 и транскрипта 5M-Loop показало, что в этом случае дискретный комплекс не образуется (рис. 3), что ясно свидетельствует о роли неспаренных остатков стебля шпильчатой структуры pre-miR390 в формировании этого комплекса. Таким образом, специфическое взаимодействие белка CmPS1 с РНК может определяться 3D-мотивами, существующими в РНК за счет некомплементарных нуклеотидных остатков.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие белка AtSerp1 с тРНК, продемонстрированное в данной работе, позволяет предполагать, что связывание РНК является общим свойством серпинов LR-группы, включающей и AtSerp1, и CmPS1 (флоэмный серпин тыквы), РНК-связывающие свойства которого были выявлены ранее [28]. С учетом того, что серпины LR-группы являются эволюционно консервативными, предполагают, что функции этих белков могут быть сходными у широкого спектра организмов от одноклеточных зеленых водорослей до цветковых растений [19]. На основании данных о том, что белок AtSerp1 может ингибировать по крайней мере три протеиназы, задействованные в индукции клеточной смерти [21, 23, 24], можно полагать, что одна из функций серпинов LR-группы заключается в регулировании проапоптотических механизмов. Вместе с тем роль связывания РНК, свойственного серпинам этой консервативной группы, в настоящий момент остается неясной.

Способность взаимодействовать с РНК может являться функцией, независимой от ингибирующей активности серпинов. Принимая во внимание данные для CmPS1, который является флоэмным белком [25], и его ортолога из

*C. sativus*, способного к транспорту по флоэме в удаленные части растения [30], было высказано предположение о том, что связывание тРНК может быть задействовано в двух различных механизмах сигналинга. Во-первых, поскольку многие мРНК, способные к транспорту по флоэме, несут в составе некодирующих областей последовательности тРНК, которые служат сигналами для транслокации таких мРНК по флоэме [29], белок CmPS1, взаимодействуя с этими РНК, может служить белком-транспортером, обеспечивающим их перенос к удаленным частям растения и/или повышающим их стабильность в ситовидных трубках флоэмы. Во-вторых, с учетом того, что цитоплазма ситовидных элементов содержит как полноразмерные тРНК, так и фрагменты тРНК, которые, как известно, выполняют регуляторные функции при ответах на стрессы и в первую очередь на вирусную инфекцию, взаимодействие CmPS1 с тРНК или их фрагментами может играть роль во флоэмном сигналинге [31]. Эта гипотеза согласуется с фактом локализации белка CmPS1 в экстрафасцикулярной флоэме, содержащей белки, выполняющие преимущественно защитные и сигнальные функции [45]. С учетом возможной роли серпинов в системном сигналинге у высших растений было бы интересно выяснить, обладают ли РНК-связывающими свойствами серпины LR-типа, кодируемые эволюционно древними организмами, не имеющими тканей и систем межклеточной коммуникации, такими как, например, одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* и колониальная зеленая водоросль *Volvox carteri*.

С другой стороны, можно предположить наличие взаимосвязи между РНК-связыванием и ингибирующей активностью серпинов, что представляется весьма вероятным с учетом их структурных особенностей, молекулярного механизма ингибирования протеиназ и ряда данных, имеющихся для серпинов животных. В частности, существенной особенностью серпинов является возможность регуляции ингибиторной активности этих белков [1, 46]. Примером такого регулируемого ингибитора может быть хорошо изученный антитромбин III человека, ингибиторная петля которого в достаточной степени экспонируется на поверхности белковой молекулы и становится полностью доступной для протеиназы только после связывания антитромбина с гепарином, который является активатором белка [47–49]. Можно предполагать, что в отсутствие гепарина в растениях тРНК может играть роль регулятора ингибиторной активности CmPS1 по аналогии с гепарином, участвующим в регуляции активности ан-

титромбина III, наиболее структурно близкого белку CmPS1 серпина человека. Действительно, показано конкурентное ингибирование гепарином формирования комплекса CmPS1–тРНК [28]. Кроме того, вполне вероятно, что ингибирование протеиназы серпином, сопряженное с кардинальным изменением его конформации, может существенным образом влиять на способность серпина связывать РНК [31].

В настоящее время для белка AtSerp1 не показана способность к транспорту по флоэме. Нельзя исключать, что AtSerp1 обладает такой способностью, однако имеющиеся данные об ингибировании белком AtSerp1 проапоптотических протеиназ, не имеющих флоэмной локализации, говорят в пользу того, что образование комплекса AtSerp1 с тРНК имеет регуляторную функцию, не связанную с флоэмным транспортом. Можно предполагать, что связывание РНК белком AtSerp1 представляет собой дополнительный уровень контроля проапоптотической активности протеиназ, являющихся мишенями AtSerp1, за счет модулирования ингибирующей активности самого белка AtSerp1. Для проверки этой гипотезы требуются дополнительные эксперименты, которые ведутся в нашей лаборатории и ставят целью выявление функциональной связи между двумя известными активностями серпинов LR-группы, а именно ингибированием протеиназ и РНК-связыванием.

В настоящей работе показано, что белок AtSerp1 обладает меньшей неспецифической РНК-связывающей активностью в сравнении с CmPS1. Вместе с тем, белки AtSerp1 и CmPS1, эффективно связывая тРНК, не проявляют выраженной специфичности в отношении каких-либо видов тРНК растений, в той или иной степени связывая все тРНК в условиях проводившихся экспериментов. Сочетание двух особенностей исследованных серпинов, высокой аффинности к тРНК по сравнению с другими высокоструктурированными РНК и способности связывать все виды тРНК, может быть объяснено взаимодействием этих белков с какими-либо элементами третичной структуры, общими для всех молекул тРНК. Такая модель представляется вполне вероятной, поскольку специфическое связывание белками молекул РНК основано на узнавании пространственных (3D) мотивов, а не элементов первичной структуры [41, 42]. Такие 3D-мотивы возникают в несовершенных дуплексах РНК за счет наличия в их составе некомплементарных оснований, способных участвовать в неканонических взаимодействиях с окружающими нуклеотидными остатками, создавая

уникальные пространственные структуры, с которыми специфически связываются соответствующие белки. С этой точки зрения можно предположить, что исследованные серпины взаимодействуют с консервативными элементами пространственной укладки полинуклеотидной цепи молекул тРНК. Способность серпинов узнавать 3D-мотивы в молекулах РНК нашла подтверждение в экспериментах по связыванию pre-miR390 белком CmPS1. Действительно, мутантный вариант pre-miR390, стебель шпильчатой структуры которого не включал неспаренные нуклеотидные остатки, утрачивал способность формировать комплекс с CmPS1, видимый в геле как дискретная полоса, тогда как другой вариант pre-miR390, сохраняющий некомплементарные остатки, способные к образованию 3D-мотивов, такой способностью обладал. Мы предполагаем, что взаимодействие с такого рода 3D-мотивами является основой специфического связывания серпинами растений некоторых структурированных РНК, таких как тРНК, тогда как неспецифическое связывание РНК, наблюдаемое для CmPS1 и, в существенно меньшей степени, для AtSerp1, имеет под собой иную основу.

Результаты, представленные в данной работе, выявляют новые особенности взаимодействия белков AtSerp1 и CmPS1 с РНК, но не могут однозначно ответить на вопрос о функциональной значимости таких взаимодействий *in vivo*. Исследование функциональной роли связывания РНК серпинами растений является задачей будущих исследований.

**Финансирование.** Работа Е.А. Толстыко, Д.А. Чергинцева, С.Ю. Морозова, А.Г. Соловьева выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01032).

**Конфликт интересов.** А.Л. Коневега является учредителем компании «Нанотемпер Технологии Рус», предоставляющей услуги по проведению исследований и представляющей технологии «NanoTemper Technologies GmbH» в России.

**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](http://www.springer.com/journal/10541)), том 86, вып. 10, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gettins, P. G. W. (2002) Serpin structure, mechanism, and function, *Chem. Rev.*, **102**, 4751-4804, doi: 10.1021/cr010170+.
- Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., et al. (2006) An overview of the serpin superfamily, *Genome Biol.*, **7**, 1-11, doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.
- Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Çataltepe, S., et al. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis, *Biochemistry*, **37**, 5258-5266, doi: 10.1021/bi972521d.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Dai, W., Brömme, D., Worrall, D. M., et al. (2002) Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering  $\alpha$ 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases, *Biochemistry*, **41**, 4998-5004, doi: 10.1021/bi0159985.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., et al. (1992) Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme, *Cell*, **69**, 597-604, doi: 10.1016/0092-8674(92)90223-Y.
- Klieber, M. A., Underhill, C., Hammond, G. L., and Muller, Y. A. (2007) Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release, *J. Biol. Chem.*, **282**, 29594-29603, doi: 10.1074/jbc.M705014200.
- Zhou, A., Wei, Z., Read, R. J., and Carrell, R. W. (2006) Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13321-13326, doi: 10.1073/pnas.0604080103.
- Mala, J. G. S., and Rose, C. (2010) Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci.*, **87**, 579-586, doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.024.
- Huntington, J. A., and Stein, P. E. (2001) Structure and properties of ovalbumin, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 189-198, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00108-6.
- Kumar, A. (2015) Bayesian phylogeny analysis of vertebrate serpins illustrates evolutionary conservation of the intron and indels based six groups classification system from lampreys for ~500 MY, *PeerJ*, **2015**, e1026, doi: 10.7717/peerj.1026.
- Marijanovic, E. M., Fodor, J., Riley, B. T., Porebski, B. T., Costa, M. G. S., et al. (2019) Reactive centre loop dynamics and serpin specificity, *Sci. Rep.*, **9**, 1-15, doi: 10.1038/s41598-019-40432-w.
- Whisstock, J. C., and Bottomley, S. P. (2006) Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 761-768, doi: 10.1016/j.sbi.2006.10.005.
- Whisstock, J. C., Skinner, R., Carrell, R. W., and Lesk, A. M. (2000) Conformational changes in serpins: I. The native and cleaved conformations of  $\alpha$ 1-antitrypsin, *J. Mol. Biol.*, **296**, 685-699, doi: 10.1006/jmbi.1999.3520.
- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., and Huber, R. (1973) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region, *J. Mol. Biol.*, **77**, 417-436, doi: 10.1016/0022-2836(73)90448-8.
- Grigoryev, S. A., and Woodcock, C. L. (1998) Chromatin structure in granulocytes. A link between tight compaction and accumulation of a heterochromatin-associated protein (MENT), *J. Biol. Chem.*, **273**, 3082-3089, doi: 10.1074/jbc.273.5.3082.
- Irving, J. A., Shushanov, S. S., Pike, R. N., Popova, E. Y., Brömme, D., et al. (2002) Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation, *J. Biol. Chem.*, **277**, 13192-13201, doi: 10.1074/jbc.M108460200.
- Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Chaudun, E., Treton, J., et al. (1998) L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3612-3619, doi: 10.1128/mcb.18.6.3612.
- Padron-Barthe, L., Lepretre, C., Martin, E., Counis, M.-F., and Torriglia, A. (2007) Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4028-4036, doi: 10.1128/mcb.01959-06.
- Cohen, M., Roberts, T. H., and Fluhr, R. (2015) Serpins in plants, in *Serpin Fam. Proteins with Mult. Funct. Heal. Dis. Cham*, Springer International Publishing, pp. 15-28.
- Roberts, T. H., and Hejgaard, J. (2008) Serpins in plants and green algae, *Funct. Integr. Genomics*, **8**, 1-27, doi: 10.1007/s10142-007-0059-2.
- Lampl, N., Alkan, N., Davydov, O., and Fluhr, R. (2013) Set-point control of RD21 protease activity by AtSerpin1 controls cell death in Arabidopsis, *Plant J.*, **74**, 498-510, doi: 10.1111/tpj.12141.
- Koh, E., Carmieli, R., Mor, A., and Fluhr, R. (2016) Singlet oxygen-induced membrane disruption and serpin-protease balance in vacuolar-driven cell death, *Plant Physiol.*, **171**, 1616-1625, doi: 10.1104/pp.15.02026.
- Lema Asqui, S., Vercammen, D., Serrano, I., Valls, M., Rivas, S., et al. (2018) AtSERPIN1 is an inhibitor of the metacaspase AtMC1-mediated cell death and autocatalytic processing in planta, *New Phytol.*, **218**, 1156-1166, doi: 10.1111/nph.14446.
- Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J. A., et al. (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9, *J. Mol. Biol.*, **364**, 625-636, doi: 10.1016/j.jmb.2006.09.010.
- Yoo, B. C., Aoki, K., Xiang, Y., Campbell, L. R., Hull, R. J., et al. (2000) Characterization of Cucurbita maxima phloem serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35122-35128, doi: 10.1074/jbc.M006060200.
- Alvarez-Alfageme, F., Maharramov, J., Carrillo, L., Vandenabeele, S., Vercammen, D., et al. (2011) Potential use of a serpin from arabidopsis for pest control, *PLoS One*, **6**, e20278, doi: 10.1371/journal.pone.0020278.
- Cohen, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2019) Plant serpin protease inhibitors: Specificity and duality of function, *J. Exp. Bot.*, **70**, 2077-2085, doi: 10.1093/jxb/ery460.
- Tolstyko, E. A., Lezzhov, A. A., Pankratenko, A. V., Serebryakova, M. V., Solov'yev, A. G., and Morozov, S. Y. (2020) Detection and *in vitro* studies of Cucurbita maxima phloem serpin-1 RNA-binding properties, *Biochimie*, **170**, 118-127, doi: 10.1016/j.biochi.2020.01.006.
- Kehr, J., and Kragler, F. (2018) Long distance RNA movement, *New Phytol.*, **218**, 29-40, doi: 10.1111/nph.15025.
- Petersen, M. L. C., Hejgaard, J., Thompson, G. A., and Schulz, A. (2005) Cucurbit phloem serpins are graft-transmissible and appear to be resistant to turnover in the sieve element-companion cell complex, *J. Exp. Bot.*, **56**, 3111-3120, doi: 10.1093/jxb/eri308.
- Tolstyko, E. A., Lezzhov, A. A., Morozov, S. Y., and Solov'yev, A. G. (2020) Phloem transport of structured RNAs: a widening repertoire of trafficking signals and protein factors, *Plant Sci.*, **299**, 110602, doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110602.
- Atabekova, A. K., Pankratenko, A. V., Makarova, S. S., Lazareva, E. A., Owens, R. A., et al. (2017) Phylogenetic and functional analyses of a plant protein related to human B-cell receptor-associated proteins, *Biochimie*, **132**, 28-37, doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.009.

33. Makarova, S. S., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2014) RNA-binding properties of the plant protein Nt-4/1, *Biochemistry*, **79**, 717-726, doi: 10.1134/S000629791407013X.
34. Asmari, M., Ratih, R., Alhazmi, H. A., El Deeb, S. (2018) Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction, *Methods*, **146**, 107-119, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.02.003.
35. Vinogradova, D. S., Zegarar, V., Maksimova, E., Nakamoto, J. A., Kasatsky, P., et al. (2020) How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs, *PLoS Biol.*, **18**, e3000593, doi: 10.1371/journal.pbio.3000593.
36. Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
37. Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., and Pütz, J. (2009) tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D159-D162, doi: 10.1093/nar/gkn772.
38. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods*, **9**, 357-359, doi: 10.1038/nmeth.1923.
39. Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., and Charles, R. (2019) Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors, *Bioinformatics*, **35**, 421-432, doi: 10.1093/bioinformatics/bty648.
40. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S. L. (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 907-915, doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
41. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
42. Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. (2014) HTSeq – a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *bioRxiv*, 002824, doi: 10.1101/002824.
43. Chojnowski, G., Waleń, T., and Bujnicki, J. M. (2014) RNA Bricks – a database of RNA 3D motifs and their interactions, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D123-31, doi: 10.1093/nar/gkt1084.
44. Leontis, N. B., Lescoute, A., and Westhof, E. (2006) The building blocks and motifs of RNA architecture, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 279-287, doi: 10.1016/j.sbi.2006.05.009.
45. Gaupels, F., and Ghirardo, A. (2013) The extrafascicular phloem is made for fighting, *Front. Plant Sci.*, **4**, 187, doi: 10.3389/fpls.2013.00187.
46. Gettins, P. G. W., and Olson, S. T. (2016) Inhibitory serpins. New insights into their folding, polymerization, regulation and clearance, *Biochem. J.*, **473**, 2273-2293, doi: 10.1042/BCJ20160014.
47. Whistock, J. C., Pike, R. N., Jin, L., Skinner, R., Pei, X. Y., et al. (2000) Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparin, *J. Mol. Biol.*, **301**, 1287-1305, doi: 10.1006/jmbi.2000.3982.
48. Rezaie, A. R. (1998) Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism: evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16824-16827, doi: 10.1074/jbc.273.27.16824.
49. Li, W., Johnson, D. J. D., Esmon, C. T., and Huntington, J. A. (2004) Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 857-862, doi: 10.1038/nsmb811.

## RNA BINDING BY PLANT SERPINS *in vitro*

E. A. Tolstyko<sup>1,2</sup>, D. A. Chergintsev<sup>3</sup>, O. A. Tolicheva<sup>2</sup>, D. S. Vinogradova<sup>2,4</sup>,  
A. L. Konevega<sup>2,5,6</sup>, S. Y. Morozov<sup>1,7</sup>, and A. G. Solovyev<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Virology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Konstantinov St. Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Center "Kurchatov Institute", 188300 Gatchina, Russia

<sup>3</sup> Department of Plant Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>4</sup> NanoTemper Technologies Rus, 191167 Saint Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint Petersburg, Russia

<sup>6</sup> National Research Center "Kurchatov Institute" 123182 Moscow, Russia

<sup>7</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Serpins constitute a large family of protease inhibitors with regulatory functions found in all living organisms. Most plant serpins have not been functionally characterized, with the exception of *Arabidopsis thaliana* AtSerp1, an inhibitor of pro-apoptotic proteases, which is involved in the regulation of the programmed cell death induction, and *Cucurbita maxima* CmPS1, a phloem protein, which presumably inhibits insect digestive proteases and binds RNA. CmPS1 interacts most efficiently with highly structured RNA; in particular, it forms a specific complex with tRNA. Here, we demonstrated that AtSerp1 also forms a complex with tRNA. Analysis of tRNA species bound by AtSerp1 and CmPS1 in the presence of tRNA excess revealed that both proteins have no strict selectivity for individual tRNAs, suggesting specific interaction of AtSerp1 and CmPS1 proteins with elements of the secondary/tertiary structure universal for all tRNAs. Analysis of CmPS1 binding of the microRNA precursor pre-miR390 and its mutants demonstrated that the pre-miR390 mutant with a perfect duplex in the hairpin stem lost the ability to form a discrete complex with CmPS1, whereas another variant of pre-miR390 with the native unpaired nucleotide residues in the stem retained this ability. These data indicate that specific interactions of plant serpins with structured RNA are based on the recognition of structurally unique spatial motifs formed with the participation of unpaired nucleotide residues in the RNA duplexes.

**Keywords:** serpin, RNA binding, RNA-binding protein, tRNA, microRNA, RNA structure, phloem

УДК 576.385

## ЛАМИН А КАК ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ФАКТОР МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЯДРА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

### Обзор

© 2021 Н.Л. Овсянникова<sup>1,2\*</sup>, С.В. Лаврушкина<sup>1,2</sup>, А.В. Иванова<sup>3</sup>,  
Л.М. Мазина<sup>3</sup>, О.А. Жиронкина<sup>1</sup>, И.И. Киреев<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: nat.ovs94@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, 117198 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.07.2021

После доработки 31.07.2021

Принята к публикации 02.08.2021

Одним из основных факторов, ухудшающих прогноз онкологических заболеваний, является метастазирование, в основе которого лежит способность опухолевых клеток к миграции из первичного очага с последующим формированием вторичных метастатических узлов. Поиск способов контроля миграции метастатических клеток является одной из актуальных задач в биомедицине. Одним из возможных подходов может стать регуляция эластических свойств клеточного ядра, поскольку именно ядро, являясь самым крупным и жестким компонентом, отвечает за механические свойства всей клетки в целом и может препятствовать ее эффективной миграции в трехмерном пространстве внеклеточного матрикса. При этом жесткость ядра может определяться ядерной ламиной — двумерной сетью промежуточных филаментов, расположенной на внутренней ядерной мембране. В этом обзоре представлены данные о наиболее значимых факторах, определяющих жесткость ядра, обсуждается роль состава ядерной оболочки в миграции клетки, а также предлагаются возможные подходы к регулированию состава ламины для изменения пластичности клеточного ядра и способности клетки к метастазированию.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ядерная ламина, ламин А, ZMPSTE24, хроматин, клеточная миграция, ламинопатии, старение, канцерогенез.

DOI: 10.31857/S0320972521100110

### ВВЕДЕНИЕ

При миграции через плотный трехмерный внеклеточный матрикс клетке необходимо изменять свою форму [1–3]. Большинство исследований подтверждает, что интерфазное ядро является значительно более жестким, чем окру-

жающая цитоплазма. Например, эксперименты по сжатию клеток между параллельными пластинами показали эффективную эластичность ядер эндотелия, равную 8 кПа, тогда как для цитоплазмы это значение составляет 0,5 кПа [4, 5]. Таким образом, цитоплазма обладает практически неограниченной пластичностью [6], в то время как ядро, в частности из-за жесткости ядерной оболочки, ограничивает способность клетки к миграции [2, 7]. Способность изменять форму ядра в соответствии с размером отверстия для миграции зависит от типа клеток, однако для любого типа клеток способность мигрировать через поры линейно падает с уменьшением размера пор. Показано, что существует пороговое значение этого параметра пор, через которое клетка не в состоянии проникнуть — в сред-

Принятые сокращения: ЭПР — эндоплазматический ретикулум; BRD4 — бромодоменисодержащий белок 4 (bromodomain-containing protein 4); H3K27me3 — триметилированный лизин-27 гистона H3; HGPS — прогерия Хатчинсона–Гилфорда (Hutchinson–Gilford progeria syndrome); LBR — рецептор ламина В (Lamin B receptor); PRC2 — репрессивный комплекс поликомб 2 (polycomb repressive complex 2); ZMPSTE24 — цинк-зависимая металлопептидаза STE24 (zinc metalloproteinase STE24).

\* Адресат для корреспонденции.

нем оно составляет 10% от диаметра ядра клетки в нормальных не деформирующих условиях [7]. Таким образом, именно ограниченная способность ядра к изменению своей формы является лимитирующим фактором при миграции клеток в трехмерном пространстве.

При этом генетический материал нуждается в защите от механических повреждений и, если не способные к миграции дрожжевые клетки имеют прочную внешнюю клеточную стенку, то животные клетки делегировали эту функцию ядерной оболочке.

Ядерная оболочка — многокомпонентная клеточная структура — помимо поддержания целостности генетического материала, оказывает регуляторное воздействие на репликацию, репарацию ДНК и регуляцию транскрипции благодаря глубокой интеграции с хроматином. Она состоит из внешней и внутренней мембран, разделенных перинуклеарным пространством шириной около 50 нм. Мембраны соприкасаются в местах расположения ядерных поровых комплексов, обеспечивающих селективный транспорт макромолекул внутрь ядра и из него в цитоплазму [8]. Внешняя мембрана обращена наружу к цитоплазме и переходит непосредственно в эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Внутренняя мембрана тесно ассоциирована с ядерной ламиной [9].

Ядерная ламина выстилает внутреннюю поверхность ядерной оболочки. Она представляет собой белковую сеть, основными компонентами которой являются белки ламины, промежуточные филаменты V-го типа, которые подразделяют на два типа: А и В. Ген *LMNA* кодирует ламины А-типа: 2 мажорных (А и С) и 4 минорных. Ламины В-типа, В1 и В2, закодированы генами *LMNB1* и *LMNB2* соответственно [10].

Ламины являются высококонсервативными белками и имеют типичное для промежуточных филаментов строение — обладают трехчастной структурой, состоящей из центрального  $\alpha$ -спирального стержневого центрального домена, фланкированного коротким глобулярным N-концевым доменом, «головой», и длинным C-концевым «хвостом». Центральный стержневой домен организован в четыре  $\alpha$ -спиральных сегмента — coil 1a, 1b, 2a и 2b, содержащих в себе повторы из семи аминокислот (гептад). Эти отдельные спирали отделены друг от друга короткими линкерами — L1, L12 и L2, из которых L12 является самым гибким. «Голова» ламина не структурирована, хвостовой же домен содержит высококонсервативный иммуноглобулин-подобный мотив — домен, вовлеченный в белок-белковые взаимодействия, а также во взаимодействия между белком и ДНК [11]. В отличие

от других типов промежуточных филаментов, ламины имеют последовательность (сигнал) ядерной локализации между C-концевым участком центрального домена и иммуноглобулин-подобным участком [12, 13].

Ламины А и В синтезируются в виде предшественников, преламинаов, которые затем проходят несколько стадий посттрансляционных модификаций, затрагивающих C-конец белков, на котором располагается характерный СААХ-мотив, где С — цистеин, А — остаток любой алифатической аминокислоты, Х — остаток любой аминокислоты. Посттрансляционные модификации включают фарнезилирование по остатку цистеина в СААХ-последовательности, терминальное карбоксиметилирование (процессы, универсальные для ламин А и В), а также специфичные для преламина А две стадии протеолиза под действием цинковой протеиназы ZMPSTE24. В итоге фарнезилированный C-конец у ламина А утрачивается, а у ламина В — сохраняется [10]. Как предполагается, фарнезилирование необходимо для таргетинга ламин к внутренней ядерной мембране [14, 15]. Эти особенности созревания разных типов ламин определяют характер их взаимодействия с ядерной мембраной, что наглядно проявляется при распаде ядерной оболочки по завершении профазы митоза: ламин А переходит в растворенное состояние в цитозоль, тогда как ламин В сохраняет связь с мембранными везикулами [16].

Подобно белкам цитоплазматических промежуточных филаментов ламины способны к полимеризации, однако механизмы этого процесса остаются не до конца исследованы. Анализ сборки ламин *in vitro* предполагает, что в результате взаимодействия coil-доменов ламин А и В типов формируют гомодимеры с параллельным расположением цепей [17, 18]. Димеры ламин взаимодействуют по принципу «голова к хвосту», что приводит к формированию протофиламента. Взаимодействие четырех протофиламентов ведет к образованию фибрилл диаметром 10 нм [19], а затем — высокоупорядоченных паракристаллических структур [20]. С другой стороны, исследования структуры ламин в соматических клетках млекопитающих методом криоэлектронной томографии показали, что сборка ламин *in situ* происходит с образованием не димеров, а тетрамеров. Последующая сборка протофиламентов не сопровождается их латеральной ассоциацией, таким образом, превалирующей формой ламин в ядерной оболочке являются фибриллы толщиной 3,5 нм [21]. Следует, однако, отметить, что данные исследования проводились на пермеабелизованных клетках, из которых основная масса хрома-

тина, маскирующего структуру ламины, была удалена в результате эндонуклеазной обработки.

Относительно организации протофиламентов в составе ламины также имеются противоречивые сведения. Ультраструктурный анализ изолированных вручную ядерных оболочек из ооцитов *X. laevis* продемонстрировал наличие ортогональной сети филаментов, ассоциированных с внутренней ядерной мембраной, легко наблюдаемой благодаря практически полному отсутствию контактов ламины с хроматином [17]. В то время как в соматических клетках сеть ламин гораздо менее плотная и в значительной степени хаотизирована [21]. Кроме того, использование световой микроскопии сверхвысокого разрешения позволило установить, что в соматических клетках ламины А и В формируют независимые, хотя и взаимодействующие системы, представленные в виде микродоменов [22, 23]. Процессы сборки и разборки ядерной ламины в митозе также регулируются посттрансляционными модификациями ламин, а именно фосфорилированием под действием киназ CDK1 и PKC [16]. Таким образом, структура ламины определяется и регулируется на нескольких уровнях: взаимодействием мономеров ламин в составе протофиламентов, взаимодействием протофиламентов в составе микродоменов, а также прочностью контактов между микродоменами.

### ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЖЕСТКОСТЬ ЯДРА

Несмотря на обнаруженное разнообразие регуляторных функций ламин, основная функция ламины состоит в защите генетического материала от механических повреждений [24]. Ясно, что разные клетки организма подвергаются различным механическим воздействиям в соответствии с выполняемыми ими функциями. Это отражается в различной жесткости тканей: ткани костей, хрящей, скелетных и сердечных мышц более жесткие, что делает их более устойчивыми к ежедневным физическим нагрузкам [25]. Показана тесная корреляция как между количеством фиброзного коллагена внеклеточного матрикса и микроэластичностью ткани, так и между эластичностью ткани и количеством ламин в ядерной оболочке [26]. То есть жесткость ламины отражает жесткость ткани: в более жестких тканях ядра также будут жестче из-за более высокого содержания ламин.

При этом ламины А- и В-типов демонстрируют различный ответ на повышение механической нагрузки: именно ламины А-типа коррелируют с различиями в жесткости ядерной оболоч- ки, тогда как уровень экспрессии ламин В практически неизменен [27–29]. Предполагается, что в случае тканей, подвергающихся механическому стрессу, именно ламины А-типа вносят основной вклад в жесткость ядерной оболочки [27, 28].

Этот вывод хорошо соотносится с тем, что ламины А являются более поздним приобретением с эволюционной точки зрения по сравнению с ламинами В, которые присутствуют практически у всех *Metazoa* [30, 31]. Помимо эволюционного аспекта, экспрессия ламин зависит от стадии онтогенеза [32]. Ламин В синтезируется во всех клетках многоклеточных организмов на всем протяжении развития. В то же время экспрессия ламин А-типа меняется при коммитировании клеток: ламин А/С отсутствует в стволовых и эмбриональных клетках, а обнаруживается только в дифференцированных клетках [33, 34], которые оказываются жестче своих эмбриональных предшественников [27]. Более того, искусственная экспрессия ламин А в ооцитах лягушек, где он в нормальных условиях отсутствует, приводит к зависящему от уровня экспрессии ламин А увеличению жесткости ядра [35].

Поскольку жесткость ядерной оболочки напрямую влияет на эффективность миграции, уровень экспрессии ламин А является важным прогностическим параметром при оценке способности клеток к миграции в трехмерном пространстве [36]. Действительно, показано, что искусственное увеличение на 10% уровня ламин А снижает эффективность миграции клеток сквозь поры диаметром 3 мкм на 90%, и наоборот, его нокадаун повышает способность клеток проникать сквозь поры малого размера [36, 37].

Важно подчеркнуть, что снижение содержания ламин А повышает эффективность миграции клеток сквозь узкие поры лишь до определенного предела. Миграция через поры малого размера требует значительной деформации ядра, которая, в свою очередь, может приводить к разрыву ядерной оболочки и повреждению ДНК [24, 38]. Причем большая деформация, связанная с повышением эластичности, увеличивает количество разрывов ДНК и вероятность клеточной гибели. Действительно, снижение количества ламин более чем на 50% от нормального уровня увеличивает вероятность апоптоза в 23 раза при миграции сквозь поры малого размера [1, 36]. Таким образом, состав ламин определяет способность клеток, с одной стороны, проникать сквозь узкие пространства, а с другой стороны, выживать после сильного механического стресса. Ярким примером справедливости

этих выводов могут служить полиморфноядерные лейкоциты, которые экспрессируют ламины на низком уровне [39], могут внедряться в любые ткани во время воспаления, но при этом гибнут путем апоптоза в течение нескольких дней [40]. Подобные наблюдения были сделаны и для гемопоэтических клеток: наиболее высокий уровень ламинин характерен для клеток-резидентов костного мозга, что препятствует их миграции сквозь эндотелиальные микропоры и выходу в кровоток [41].

Интересно отметить, что некоторые типы клеток, имея способность изменять размеры пор внеклеточного матрикса за счет работы металлопротеиназ, расширяют поры до размера ядра и таким образом избегают значительных изменений формы ядра, минимизируя его деформацию [7].

В отличие от ламин A, экспрессия которого коррелирует с жесткостью ядерной оболочки и способностью клетки к миграции, роль ламин B-типа в этих процессах менее однозначна.

Ламин B-типа обеспечивают каркасную функцию ядерной оболочки и отвечают за местоположение ядерных поровых комплексов внутри ламин [42]. Ключевую роль в поддержании доменной структуры ламин играет ламин B1. Нокадаун ламин B1 приводит к нарушению организации структуры микродоменов ламин A/C и B2 и нарушению пространственной организации ядерной оболочки, выражающемуся в формировании «почек», обогащенных ламин A/C и не имеющих B2 в своем составе [22]. Кроме того, скорость обмена ламин B ниже скорости обмена ламин A [23, 43].

Ключевую роль играют ламин B в ходе нейrogenеза. Нокауты ламин B1 и B2 летальны, мышата погибали в течение нескольких часов после рождения [44, 45]. У новорожденных обнаружена микроцефалия и снижена клеточность переднего мозга, что указывает на снижение выживаемости нейронов [45]. Скорее всего, дефекты связаны с ослаблением ядерной ламин из-за отсутствия ламин B-типа, в результате чего в процессе миграции нейронов при кортикогенезе возникают разрывы ядерной мембраны, ведущие к повреждению ДНК и гибели клеток [46]. В этом же исследовании была показана ограниченная способность ламин B2 замещать ламин B1 — в нейронах с нокаутом *LMNB1* гиперэкспрессия ламин B2 снижает, но не предотвращает разрывы ядерной мембраны и гибель клеток.

Все эти факты указывают на определяющую роль ламин B-типа для функционирования клетки. При этом, однако, вклад ламин B выражен на стадии эмбриогенеза и в постнатальном

развитии мягких тканей, таких как ткани мозга, где ламин A-типа представлены ламин C или не обнаружены. Таким образом, ламин B-типа также являются важными участниками в ответе на механический стресс, однако их вклад в жесткость и прочность наиболее заметен при отсутствии ламин A-типа, в частности в мягких тканях.

Помимо ядерной оболочки, в стабилизации формы ядра в условиях механического стресса участвует хроматин. Эксперименты с изолированными ядрами, обработанными микрококковой нуклеазой для удаления всей ДНК, показали, что сами по себе ламин не могут поддерживать форму ядра. В отсутствие хроматина ядро демонстрирует высокую пластичность под механической нагрузкой [47].

С биофизической точки зрения хроматин представляет собой полимер с различной степенью уплотнения [48]. Само же ядро описывают с помощью хемомеханической модели, согласно которой на периферии ядра располагается полужесткая сеть ламин, а внутри — вязкоупругий полимерный хроматиновый гель [47]. Исследования показывают, что при небольших (на несколько микрон) кратковременных деформациях хроматин действует подобно упругой пружине [49, 50]. При этом длительное (более 30 мин) или большое по величине приложение силы вызывает реорганизацию ядерного пространства, в том числе изменение компактизации хроматина и перемещение ядерных телц [51]. Хотя и с точки зрения реологии увеличение жесткости при уплотнении [52, 53] закономерно для подобного полимера, нельзя исключать вариант компактизации за счет изменения эпигенетического состояния, активированного через сигнальные пути в результате стресса.

Таким образом, хроматин, вероятно, играет главную роль в ответе на малые и краткие воздействия, где он ведет себя подобно упругой пружине. Также он отвечает за первичный ответ при более длительных и сильных стрессах, когда нивелирование воздействия происходит за счет реорганизации хроматина. В то же время ядерная ламин обуславливает вторичный ответ и адаптацию к механическим воздействиям за счет увеличения своей жесткости.

Существуют и другие компоненты ядерной ламин, которые поддерживают ее целостность и вовлечены в регуляцию жесткости ядра. Действительно, ядерная оболочка — многокомпонентная структура, где мажорные белки-ламин взаимодействуют с более чем 100 ламин-ассоциированными белками, функции которых варьируют от передачи механического сигнала между ядром и цитоплазмой до участия в регуля-

ции миграции и дифференцировки клеток [54]. Для некоторых из этих белков была показана связь между уровнем их экспрессии и жесткостью ядерной оболочки. В частности, эмерин [55], а также SUN-белки совместно с неспринами [56], отвечающие за передачу механического сигнала от цитоскелета к ядерной ламине и хроматину, изменяют свой уровень экспрессии в тканях разной жесткости [57]. Тем не менее их функционирование и локализацию во многом определяет ламин А. Действительно, было показано, что при экспрессии ламина А без сигнала ядерной локализации эмерин агрегирует с ним на ЭПР [58]. Нарушение локализации эмерина в присутствии прогерина, мутантной формы ламина А, наблюдали и в митозе, где эмерин с поддержкой диффундирует в цитоплазму и рекрутируется к ядерной ламине после цитокинеза, образуя агрегаты с прогерином в цитоплазме [59]. Для SUN-белков получены аналогичные результаты. Chen et al. [60] показали, что SUN1 не только колокализуется с прогерином, но и накапливается в ядерных складках, в то время как для SUN2-белков было описано снижение мобильности [61]. Кроме того, во время митоза SUN1 не деградирует, а образует агрегаты в перинуклеарном пространстве, тем самым нарушая структуру ядерной оболочки и ЭПР [60]. Эти данные свидетельствуют о том, что несмотря на корреляцию между жесткостью ядра и уровнем экспрессии эмерина, SUN-белков и неспринов, именно ламин А является главным регулятором их локализации и функционирования.

Сходные результаты были получены для LBR, рецептора ламина В, однако, в отличие от обсуждаемых выше белков, для LBR была показана обратная зависимость уровня экспрессии относительно ламина А. Действительно, в экспериментах, где уровень экспрессии ламина А повышался в ответ на увеличение жесткости подложки, на которой культивировали клетки [26], для LBR была показана обратная корреляция. В случае LBR оказалось, что его экспрессия максимальна в клетках, культивируемых на мягких подложках, и снижается при увеличении жесткости [62]. Однако, в отличие от ламинов, LBR, скорее всего, не является структурным элементом и не обеспечивает прочность ядра сам по себе. Основной функцией LBR считается прикрепление гетерохроматина к ядерной ламине, причем ламин А составляет ему конкуренцию в этом взаимодействии [63]. Предположительно, по мере дифференцировки ламина А вытесняет часть LBR из взаимодействия с гетерохроматином, а также, возможно, подавляет экспрессию LBR. Таким образом, выполняя свою основную функцию, прикрепление пери-

ферического гетерохроматина к ядерной ламине, LBR лишь опосредованно участвует в ответе на механический стресс.

Можно заключить, что для многочисленных компонентов ядерной мембраны взаимодействие с ламин А важно для их правильной локализации и функционирования. Вероятно, в случае механической нагрузки ламин А выступает в качестве первичного сенсора, который далее активирует ремоделирование ядерной оболочки. В то же время большое разнообразие взаимодействий ламина А обеспечивает разнообразие ответов на механический стресс, которые могут быть специфичными как для ткани, так и для конкретной клетки.

### ЛАМИН А И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

В связи с тем, что жесткость ядерной оболочки определяет как защиту генетического материала от внешних повреждений, так и способность клетки к миграции, можно ожидать, что в трансформированных и нормальных клетках пластичность ядра, а значит и состав ламины, будет различаться. Действительно, частым следствием опухолевой трансформации является изменение морфологии ядер клеток. Это выражается в увеличенных размерах, деформации ядерной оболочки, а также в нарушении локализации внутриядерных доменов и хроматина [64]. При этом показано, что приобретение иного ядерного фенотипа опухолевыми клетками по сравнению с клетками нормальной ткани часто связано с изменением экспрессии генов структурных белков ядерной ламины. Уровни ламинов А/С, как и ламинов В, изменяются при различных опухолевых заболеваниях, из чего следует, что ламины либо играют важную роль в прогрессировании рака, либо их уровень экспрессии меняется вследствие злокачественных изменений. Тем не менее не существует единой закономерности, описывающей изменение экспрессии ламинов при опухолевой трансформации. Например, гиперэкспрессия ламинов А/С отчетливо проявляется при карциноме яичников, сквамозно-клеточной карциноме и колоректальном раке [65–67]. При этом уровень их экспрессии снижается при базальноклеточной карциноме, лимфоме, раке молочной железы и желудка [68–71]. Для ламинов В также нет единой для всех видов опухолей тенденции: так, повышенная экспрессия ламина В наблюдается при раке простаты, яичников, поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме, пониженная — при раке молочной железы и раке толстого кишечника [25].

Такие различия указывают на то, что развитие определенных видов опухолей либо стадий опухолевой прогрессии связано с разными функциями ламин и опосредовано их влиянием на множество процессов, таких как пролиферация, передача сигнала, дифференцировка и миграция [37].

При этом в пределах определенной группы опухолей с аналогичными характеристиками экспрессия ламин в некоторых случаях используется в качестве маркера для разделения на подтипы. Так, среди различных видов рака легких — мелкоклеточного рака легких, сквамозноклеточной карциномы и аденокарциномы — была описана дифференциальная экспрессия генов ламин А и В [72]. В некоторых случаях явная корреляция между уровнем экспрессии ламин А и прогрессией опухоли позволяет использовать ламин В в качестве диагностического маркера: циркулирующий ламин В в сочетании с виментином используется для ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы [73]. Также уровень экспрессии ламин А может служить для оценки благоприятности прогноза — например, у больных раком толстой кишки II и III стадии повышен риск рецидива, если опухолевые клетки не содержат ламин А/С в составе ядерной оболочки [74]. Снижение экспрессии ламин А при ранних стадиях карциномы молочных желез коррелирует с худшим прогнозом и предположенностью к сосудистой инвазии [70].

Предполагается, что снижение концентрации ламин в составе ядерной ламин приводит к образованию более пластичных ядер. Способность к сильной деформации может благоприятствовать успешному прохождению клеток сквозь базальную мембрану и сужения, сформированные внеклеточным матриксом, и таким образом облегчать распространение злокачественных клеток и формирование метастазов [75, 76]. Так, определяющая роль сниженного уровня экспрессии ламин А для образования метастазов показана для клеток легочной аденокарциномы [77]. Прямую связь между уровнем экспрессии ламин А, жесткостью ядра, способностью к метастазированию и агрессивностью опухоли показали для рака простаты [78]. При раке яичника сниженный уровень экспрессии ламин А коррелирует с худшим прогнозом, тогда как его более высокий уровень экспрессии ассоциирован с лучшей выживаемостью пациентов [79]. Интересно, что в той же работе показали, что снижение уровня ламин А/С на 30–40% позволяло клеткам с большей эффективностью мигрировать через поры малого размера (3 мкм), однако при подавлении экспрессии на 70–80% миграция снижалась до конт-

рольной. Также при значительном нокдауне наблюдалось формирование микроядер и увеличение повреждения ДНК, нарушения системы репарации ДНК, что вероятно и было причиной снижения миграции. Таким образом, может существовать отбор, где, с одной стороны, недостаточное снижение экспрессии белка приводит к неэффективному метастазированию, а с другой — значительная потеря ведет к повреждению ДНК при миграции и к гибели клетки.

Действительно, было показано, что клетки аденокарциномы меньше подвержены апоптозу после аспирации, чем неопухолевые клетки, однако нокдаун ламин А значительно снижает их устойчивость к механическому стрессу [80]. В то же время в другом исследовании показали, что снижение ламин А в мышечных клетках меланомы и карциномы легкого ведет к увеличению миграции *in vitro* через узкие поры (3 мкм). Тем не менее нокдаун белка не давал преимуществ *in vivo* при экстравазации из сосудов легкого мыши. Кроме того, клетки, дефицитные по ламин А, формировали меньше вторичных очагов в паренхиме легкого, а при культивировании на мягком агаре — сфероиды меньшего объема. Несмотря на сравнимое с контролем число повреждений ДНК и апоптотическую активность, клетки со сниженным уровнем белка демонстрировали низкую пролиферативную активность [81]. Таким образом, снижение ламин А/С не всегда дает преимущества для опухолевых клеток в инвазии. Кроме того, как показано выше, дефицит ламин А/С может быть ассоциирован со снижением пролиферативной активности и клеточным старением, однако молекулярные механизмы данных процессов остаются не до конца изученными.

Возможно, помимо физической защиты хроматина от повреждения, ламин А работает как регулятор транскрипции. Подобное свойство обнаружено у ламин В. Известно, что снижение уровня ламин В ассоциировано с раком легких: подавление ламин В1 в эпителиальных клетках легких способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, миграции клеток, росту опухоли и метастазированию [82]. Оказалось, что этот эффект обусловлен не только непосредственным влиянием количества ламин В на жесткость ламин, но и их регуляторными функциями. Ламин В1 связывает определенные области генома, которые характеризуются репрессивным состоянием хроматина и низким уровнем транскрипции [83], а значит, изменение уровня экспрессии ламин В1 будет оказывать влияние на всех партнеров этого белка. В работе Jia et al. было показано, что ламин В рекрутирует комплекс PRC2, который за счет эпигенетических меток H3K27me3

индуцирует сайленсинг генов, в том числе вовлеченных в миграцию клеток. Было показано, что потеря даже одного из аллелей ламина В1 индуцировала активацию протоонкогена *RET* и его корецептора *GFRα1* и приводила к образованию спонтанных опухолей легких. По-видимому, рецептор, кодируемый *RET*, является важным медиатором каскада, индуцированного снижением экспрессии ламина В1, поскольку одновременное подавление экспрессии гена *RET* и ламина В блокирует миграцию, рост опухоли и метастазирование. Клиническая значимость этих результатов была подтверждена анализом образцов опухоли легких человека, который показал обратную корреляцию между уровнем ламина В1 и экспрессией гена *RET* [82].

Эффекты, наблюдаемые при снижении уровня ламина В1, могут быть также обусловлены взаимодействием ламина В с гистоновыми метилтрансферазами *EZH1* и *EZH2*, которые катализируют появление гистоновой метки *H3K27me3*, характерной для гетерохроматина. При подавлении *EZH1* наблюдается тот же злокачественный фенотип, обусловленный активацией гена *RET*, что и при недостатке ламина В. Пациенты с раком легких, в тканях которых наблюдались низкие уровни экспрессии *EZH1*, имели значительно худший прогноз, чем пациенты с более высокой экспрессией *EZH1* [84].

Эти результаты подтверждают, что снижение уровня экспрессии ламина В1 может играть роль в стимулировании инициации, прогрессирования и злокачественности рака легких. Ламин В1 действует как опухолевый супрессор при раке легких, а эпигенетическая депрессия *RET* из-за потери рекрутирования *PRC2* и *EZH1* на хроматин индуцирует злокачественный фенотип в эпителиальных клетках легких со сниженным уровнем ламина В1.

Как уже было сказано выше, снижение жесткости ламины и, соответственно, увеличение ее пластичности может происходить лишь до определенного предела, т.к. избыточная деформация ядра связана с повреждением генетического материала. Можно предположить, что именно по этой причине в случае некоторых опухолей наблюдается не снижение, а повышение уровня экспрессии ламинов. Действительно, в клетках аденокарциномы с повышенным уровнем ламина А снижается частота повреждений ДНК при миграции через узкие поры (3 мкм) [79]. Аналогично, для клеток рака поджелудочной железы показано, что повышенная экспрессия ламина А коррелирует и с жесткостью ядра, и с инвазивным потенциалом клетки [85]. Повышение уровня экспрессии ламина А обнаружено и в клетках рака простаты и коррелирует со степенью инва-

зии [86]. В том же исследовании показано, что гиперэкспрессия ламина А усиливает активность клеточного пути *PI3K/AKT/PTEN* за счет петли обратной связи ламина А — *PI3K*.

Кроме того, повышение уровня ламина А может быть важным для формирования вторичного очага циркулирующими опухолевыми клетками. Оказалось, что при переводе клеток в суспензию разрушение цитоскелета компенсируется стабилизацией ламина А. При повторном прикреплении к подложке клетки обладали большей адгезией, формировали больше фокальных контактов и стресс-фибрилл по сравнению с клетками, постоянно культивируемыми на подложке. В то же время подвижность повторно прикрепленных клеток была снижена, что, вероятно, связано с увеличением адгезии. Через 48 ч после прикрепления содержание в них ламина А снижалось до характерного для адгезионной культуры. Жесткость поверхности также была повышена как минимум в течение 12 ч. Кроме того, нокдаун ламина А приводил к снижению эффективности повторного прикрепления, что подтверждает гипотезу о том, что ламин А может координировать восстановление цитоскелета и, в частности, организацию актина [87]. Таким образом, гиперэкспрессия ламина А может давать преимущество за счет более эффективного прикрепления циркулирующих опухолевых клеток к эндотелию, однако значительное повышение уровня белка может снизить дальнейшую экстравазацию из-за низкой подвижности, связанной как с высокой адгезией, так и с высокой жесткостью клетки. Также следует отметить, что на данный момент случаев, когда повышение уровня экспрессии ламина А связано с повышением метастатической активности, известно намного меньше, чем примеров обратной зависимости.

Для ламинов В в ряде работ также показана прямая связь между уровнем его экспрессии и метастазированием. Обнаружено, что в опухолях поджелудочной железы повышенная экспрессия ламина В1 коррелирует с низким уровнем дифференцировки и высоким метастатическим и пролиферативным потенциалом [88]. Напротив, сниженная экспрессия ламина В1 ингибирует формирование рака толстой кишки за счет запуска процессов старения и экспрессии белков *p53* и *p21* [89]. По-видимому, как и во время эмбрионального развития [45], ламин В1 поддерживает жизнеспособность мигрирующих клеток, защищая геном от механических повреждений.

Тем не менее и в случае канцерогенеза не следует все эффекты повышения уровня экспрессии ламинов сводить только к механическим свойствам ядерной оболочки и недо-

оценивать регуляторный аспект. Так, один из возможных механизмов, объясняющих влияние ламина В на миграцию клеток, основан на регуляции связи ядра с цитоскелетом. На клетках меланомы было показано, что повышение уровня экспрессии ламина В1 предотвращает образование перинуклеарного актина и приводит к увеличению эффективности клеточной миграции. По-видимому, повышенный уровень экспрессии ламина В1 может способствовать миграции клеток за счет ингибирования ассоциации ядерной оболочки с актиновыми филаментами, что увеличивает пластичность клетки [90].

Таким образом, современные данные показывают, что ламины играют важную роль при опухолевой трансформации клеток и могут быть важной мишенью для противоопухолевой терапии. При этом следует учитывать, что разнообразие механизмов канцерогенеза, широкий спектр функций ламин, а также иногда противоположные эффекты, наблюдаемые при изменении уровня экспрессии ламин в разных типах опухолей, не позволяют ожидать единого решения для всех видов злокачественных новообразований. Поиск терапевтических решений, нацеленных на ламины, требует тщательного изучения роли ламин в каждом виде опухоли и их влиянии на каждом этапе ее малигнизации и прогрессии.

### ЛАМИНОПАТИИ: ОДИН ГЕН – МНОЖЕСТВО ФУНКЦИЙ

В связи с тем, что ламины являются перспективной мишенью для противоопухолевой терапии, важным объектом изучения являются ламинопатии – группа заболеваний, связанных с нарушением экспрессии одного из генов ламин. На данный момент известно как минимум 500 мутаций в ламине А/С и 15 связанных с ними патологий [91]. Совершенно иначе обстоит дело с ламинами В-типа. До недавнего времени было известно только два заболевания – аутосомно-доминантная лейкодистрофия и приобретенная частичная липодистрофия (синдром Барракера). Первое является нейродегенеративным заболеванием, вызывающим потерю миелина в центральной нервной системе в зрелом возрасте. Оно обусловлено дупликацией гена *LMNB1*, приводящей к гиперэкспрессии белка [92]. Предрасположенность к развитию синдрома Барракера ассоциирована с однонуклеотидными полиморфизмами в гене *LMNB2* [93]. Кроме того, недавно была описана группа мутаций *LMNB1* в *coil*-доменах, ассоциированная с аутосомно-доминантной микроцефалией [94].

Ламинопатии можно условно разделить на две подгруппы. К первой относят заболевания, при которых критическим изменениям подвергаются клетки определенного происхождения, такие ламинопатии являются тканеспецифичными [95]. Чаще всего они поражают клетки жировой или мышечной ткани. К этой подгруппе относят мандибулоакральную дисплазию [96], семейную парциальную липодистрофию 2-го типа [97], генерализованную липоатрофию [98], при которых наблюдается нарушение развития жировой и костной тканей. Некоторые мутации вызывают мышечные дистрофии и миопатии. У пациентов с данным видом ламинопатий также развивается дилатационная кардиомиопатия, что чаще всего и является причиной летального исхода. Также был описан другой вид мутаций *LMNA*, которые опосредуют проявления признаков дилатационной кардиомиопатии, но при этом скелетные мышцы не подвергаются повреждениям [99]. Ламинопатии нервной ткани редки и включают на текущий момент одно заболевание – болезнь Шарко–Мари–Тута, тип 2В1, которая ассоциирована с гомозиготной мутацией *LMNA* R298C и является крайне редким нарушением функционирования моторных и сенсорных волокон периферической нервной системы [100].

Вторую подгруппу ламинопатий формируют прогероидные синдромы, при которых наблюдается повреждение нескольких систем организма и некоторые признаки преждевременного старения. Прогерия Хатчинсона–Гилфорда (HGPS) является наиболее изученным заболеванием в этой категории. Данная патология отличается ранней манифестацией: первые признаки прогерии проявляются в первые годы постнатального развития и включают задержку роста, запоздалое прорезывание зубов, микрогнатию, алопецию и склеродермальные изменения кожи. С возрастом также развиваются заболевания коронарных артерий и остеопороз. Пациенты с прогерией, как правило, умирают до достижения 20 лет в результате инфаркта или инсульта [101, 102]. Распространенной мутацией *LMNA*, сопряженной с фенотипом HGPS, является G608G (с.1824C>T), которая активирует скрытый сайт сплайсинга – в результате зрелая мРНК содержит делецию в 150 н.о. Полученный усеченный белок не содержит сайта узнавания протеиназы ZMPSTE24, что ведет к неправильному созреванию белка и образованию стабильно фарнезилированной и карбоксиметилированной изоформы белка ламина А, называемой прогерином или ламинотомом АΔ50. Сформированный белок по своему строению напоминает проламин А [101].

К ламинопатиям также относят заболевания, вызываемые мутациями белков, взаимодействующих с ламинами. Так, мутации в гене *ZMPSTE24*, в результате которых теряется каталитическая активность, ассоциированы как с тканеспецифичными [103], так и с мультисистемными заболеваниями: атипичным HGPS и рестриктивной дермопатией. Последняя связана с полной потерей активности фермента, которая может быть вызвана одной из 10 обнаруженных мутаций [104]. Рестриктивная дермопатия отличается высокой тяжестью фенотипа [105] и встречается достаточно редко — на данный момент описано около 60 случаев [106]. Клинические проявления наблюдаются при рождении и легко узнаваемы: тонкая, но при этом жесткая кожа с возникающими эрозиями в местах изгибов, поверхностные сосуды, типичный дисморфизм лица, а также множественные контрактуры суставов. Большинство младенцев с рестриктивной дермопатией погибают на первой неделе жизни [107]. Из-за снижения активности *ZMPSTE24* в случае как атипичного HGPS, так и рестриктивной дермопатии, на ядерной оболочке накапливается преламин А, который сохраняет свой фарнезилированный хвост подобно прогерину и отвечает за те же ядерные дефекты [108].

Интересно отметить, что и преламин А и прогерин детектируются и при нормальном старении. Так, у единичных клеток в первичной культуре фибробластов, полученных от пожилых здоровых людей (81–96 лет), наблюдаются нарушение формы ядра, изменение эпигенетических паттернов и другие ядерные аномалии, похожие на проявления HGPS [109]. Кроме того, в клетках пожилых людей, как и в клетках пациентов с HGPS, ядерные дефекты усиливаются с пассажем, что не наблюдается для первичных фибробластов молодых здоровых доноров (3–11 лет). Дефекты в основном связаны с асимметрией ядра и повышением числа не восстановленных повреждений ДНК, которые детектируются как фокусы фосфорилированного гистона H2AX.

На данный момент механизмы, лежащие в основе патогенеза и разнообразия ламинопатий, не совсем ясны. Существует несколько гипотез, основанных на изученных функциях ядерной ламины. Согласно первой («структурной») гипотезе, предполагается, что нарушение структуры ламин приводит к формированию хрупких ядер и способствует разрушению клеток и тканей, подверженных постоянному механическому воздействию [72, 110]. Вторая гипотеза утверждает, что ядерная ламина скорее регулирует экспрессию генов, чем играет роль

каркаса. Действительно, неоспоримо участие ядерной ламины в изменении активности генов на разных уровнях, например, за счет организации хроматина, секвестирования белков, вовлеченных в различные клеточные пути [72, 111]. Однако с накоплением данных в области механотрансдукции стало понятно, насколько сильно связаны между собой механические свойства ядерной оболочки, ее контакт с цитоскелетом и регуляция активности генов. На основе полученных знаний была сформулирована новая гипотеза, объединяющая две вышеописанные. Она постулирует, что при ламинопатиях нарушаются сложные взаимосвязанные механизмы механотрансдукции, организации хроматина и регуляции экспрессии, главным звеном которых является ядерная ламина [112].

### МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ ПРИ ПРОГЕРИИ

Прогерин, накапливающийся в клетках при прогерии Хатчинсона–Гилфорда, представляет собой чрезвычайно интересный объект для изучения в первую очередь в связи с тем, что он способствует снижению пластичности ядра. Отсутствие сайта узнавания протеиназы *ZMPSTE24* и неправильное созревание белка приводит к накоплению стабильно фарнезилированной и карбоксиметилированной изоформы белка ламина А. По своему строению прогерин напоминает ламины В-типа, в норме сохраняющие фарнезильную группу, что обеспечивает их хорошее взаимодействие с ядерной мембраной [113, 114].

В связи с тем, что пластичность ядра оказывает определяющее влияние на способность клеток к миграции, можно предположить, что накопление прогерина будет препятствовать этому процессу. Действительно, при экспрессии прогерина в клетках аденокарциномы человека A549 эффективность миграции снижалась вдвое в трансвеллах с порами диаметром 8 мкм, покрытых матригелем [115]. Это верно и для первичных фибробластов, взятых у пациентов с прогерией: только около 30% клеток мигрировали через микрофлюидные камеры с порами размером 6–10 мкм, в то время как для первичных фибробластов здоровых людей доля мигрировавших клеток достигает 80% [116]. Наши систематические исследования на клеточной линии фибросаркомы человека HT1080 подтверждают изложенные выше данные: при экспрессии прогерина доля мигрировавших клеток через поры с диаметром 3 мкм снижалась в три раза [117].

При этом, несмотря на общее увеличение жесткости в присутствии прогерина и преламина, ядро становится более хрупким на излом. Так, в клетках, взятых у больных прогерией, чаще обнаруживают ядерные почки — свидетельства недавних разломов ядерной оболочки [118]. При миграции через узкие поры в ядре в норме также могут возникать разрывы [119], однако в случае клеток HGPS-пациентов их содержание повышено [120]. Кроме того, нарушение целостности ядерной оболочки, по-видимому, индуцирует разрывы ДНК, что объясняет повышенную вероятность повреждения как у больных прогерией [121], так и в случае миграции клеток в узких пространствах [122].

Любопытно, что несмотря на чрезвычайно высокий уровень повреждения ДНК, у пациентов с прогерией Хатчинсона—Гилфорда не было выявлено случаев формирования очагов опухолевого роста [121], что, с одной стороны, может быть связано с ранней смертностью больных, а с другой, с активацией сигнальных путей, препятствующих дедифференцировке клеток в результате экспрессии прогерина [123]. Показано, что в клетках HGPS повышена онкосупрессорная активность белка BRD4 [123], причем его действие независимо от p53- и Rb-сигнальных путей. Предполагается, что BRD4 обеспечивает устойчивость к онкогенной трансформации за счет индуцируемого прогеринном перераспределения его сайтов связывания по всему геному.

По-видимому, экспрессия прогерина и преламина может ингибировать метастазирование не только за счет увеличения жесткости ядра, но и за счет подавления путей дедифференцировки и пролиферации или активации «старения».

Таким образом, изменение состава ядерной оболочки действительно может быть эффективным способом регуляции способности клетки к миграции.

Важно отметить, что накопление преламина А можно индуцировать с помощью ингибирования последней стадии созревания ламина А, за которую отвечает специфическая протеиназа ZMPSTE24. В связи с этим ZMPSTE24 является потенциальной мишенью для терапии, направленной на подавление метастазирования [124]. Интересно, что сегодня уже существуют фармацевтические препараты, способные ингибировать активность ZMPSTE24. В частности, прототипами потенциальных низкомолекулярных ингибиторов могут служить ингибиторы ВИЧ-протеиназ, например лопинавир, который наиболее эффективно ингибирует активность ZMPSTE24 и приводит к накоплению преламина [125]. Лопинавир является хорошо исследованным фармацевтическим препаратом с долгой историей

применения и тщательно изученными эффектами. Важно подчеркнуть, что большинство исследований по индукции накопления преламина А с помощью ингибирования ZMPSTE24 показывают полную обратимость эффектов после удаления лопинавира. Например, через 5–7 ч после отмывки от лопинавира в клетках остеосаркомы человека Saos-2 уровень преламина А падает примерно в 2 раза и через 24 ч уже не детектируется вестерн-блоттингом [126].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность регулировать механические свойства ядерной оболочки, а значит, и способность клетки к миграции и, в частности, к метастазированию, является заманчивой перспективой и, по-видимому, достижимым результатом. Пониженная экспрессия ламина А в опухолях приводит к повышению пластичности ядра, что, в свою очередь, облегчает миграцию опухолевых клеток в ограниченном пространстве при метастазировании, и повышению уровня генетической нестабильности трансформированных клеток из-за возникновения разрывов ДНК при деформации ядер. С другой стороны, нарушение созревания ламина А, например, при прогероидных синдромах ламинопатийного происхождения (прогерия Хатчинсона—Гилфорда, рестриктивная дермопатия и др.) приводит к увеличению жесткости ядерной оболочки. Анализ этих данных позволяет предположить, что возможным эффективным путем изменения пластичности ядра может быть направленное воздействие на ферменты созревания ламина А, в первую очередь ZMPSTE24. Использование ингибиторов ZMPSTE24 для индукции накопления непротессированной формы ламина А и увеличения жесткости ядер может рассматриваться в качестве элемента комплексной терапии некоторых типов опухолей для торможения метастазирования после удаления первичного очага. Однако важно подчеркнуть, что увеличение жесткости ядерной оболочки не всегда связано со сниженной способностью к метастазированию, в некоторых случаях наблюдается обратная зависимость. В связи с тем, что причины такой вариабельности неизвестны, требуются дальнейшие исследования роли ядерной оболочки при метастазировании, а также механизмов влияния уровня экспрессии ламина А на этот процесс.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фунда-

ментальных исследований (проект № 19-315-90069) и Российского научного фонда (проект № 171501290П).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Екатерине Рюминой за помощь в технической подготовке текста.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.-R., Vargas, P., et al. (2016) ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death, *Science*, **352**, 359-362, doi: 10.1126/science.aad7611.
2. Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., et al. (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing, *Nature*, **453**, 51-55, doi: 10.1038/nature06887.
3. Denais, C.M., Gilbert, R. M., Isermann, P., McGregor, A. L., te Lindert, M., et al. (2016) Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration, *Science*, **352**, 353-358, doi: 10.1126/science.aad7297.
4. Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., and Meister, J.-J. (2002) Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells, *J. Biomech.*, **35**, 177-187, doi: 10.1016/S0021-9290(01)00201-9.
5. Guilak, F., Tedrow, J. R., and Burgkart, R. (2000) Viscoelastic properties of the cell nucleus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 781-786, doi: 10.1006/bbrc.2000.2360.
6. Shankar, A., Syamala, S., and Kalidindi, S. (2010) Insufficient rest or sleep and its relation to cardiovascular disease, diabetes and obesity in a national, multiethnic sample, *PLoS One*, **5**, e14189, doi: 10.1371/journal.pone.0014189.
7. Wolf, K., te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., te Riet, J., et al. (2013) Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force, *J. Cell Biol.*, **201**, 1069-1084, doi: 10.1083/jcb.201210152.
8. Finlan, L.E., and Bickmore, W.A. (2008) Porin new light onto chromatin and nuclear organization, *Genome Biol.*, **9**, 222, doi: 10.1186/gb-2008-9-5-222.
9. Mewborn, S. K., Puckelwartz, M. J., Abuisneineh, F., Fahrenbach, J. P., Zhang, Y., et al. (2010) Altered chromosomal positioning, compaction, and gene expression with a lamin A/C gene mutation, *PLoS One*, **5**, e14342, doi: 10.1371/journal.pone.0014342.
10. Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., and Goldman, R. D. (2010) Nuclear lamins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, 1-23, doi: 10.1101/cshperspect.a000547.
11. Schirmer, E.C., Guan, T., and Gerace, L. (2001) Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization, *J. Cell Biol.*, **152**, 479-489, doi: 10.1083/jcb.153.3.479.
12. Fuchs, E., Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 345-82, doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002021.
13. McKeon, F. D., Kirschner, M. W., and Caput, D. (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins, *Nature*, **319**, 463-468, doi: 10.1038/319463a0.
14. Rusiñol, A. E., Sinensky, M. S. (2006) Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors, *J. Cell Sci.*, **119**, 3265-3272, doi: 10.1242/jcs.03156.
15. Adam, S.A., Butin-Israeli, V., Cleland, M. M., Shimi, T., and Goldman, R. D. (2013) Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors, *Nucleus*, **4**, 142-150, doi: 10.4161/nucl.24089.
16. Güttinger, S., Laurell, E., and Kutay, U. (2009) Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 178-191, doi: 10.1038/nrm2641.
17. Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L., Gerace, L. (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments, *Nature*, **323**, 560-564, doi: 10.1038/323560a0.
18. Hennekes, H., Nigg, E.A. (1994) The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties, *J. Cell Sci.*, **107**, 1019-29.
19. Stuurman, N., Heins, S., and Aebi, U. (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions, *J. Struct. Biol.*, **122**, 42-66, doi: 10.1006/jsbi.1998.3987.
20. Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S. A., and Goldman, R. D. (2010) Nuclear lamins in cell regulation and disease, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **75**, 525-531, doi: 10.1101/sqb.2010.75.045.
21. Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A. E., Shimi, T., Khayat, M., et al. (2017) The molecular architecture of lamins in somatic cells, *Nature*, **543**, 261-264, doi: 10.1038/nature21382.
22. Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S. I., Pack, C. G., Solovei, I., et al. (2008) The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription, *Genes Dev.*, **22**, 3409-3421, doi: 10.1101/gad.1735208.
23. Zhironkina, O. A., Kurchashova, S. Y., Pozharskaia, V. A., Cherepanynets, V. D., Strelkova, O. S., et al. (2016) Mechanisms of nuclear lamina growth in interphase, *Histochem. Cell Biol.*, **145**, 419-432, doi: 10.1007/s00418-016-1419-6.
24. Cho, S., Vashisth, M., Abbas, A., Majkut, S., Vogel, K., Xia, Y., et al. (2019) Mechanosensing by the lamina protects against nuclear rupture, DNA damage, and cell-cycle arrest, *Dev. Cell*, **49**, 920-935, doi: 10.1016/j.devcel.2019.04.020.
25. Irianto, J., Pfeifer, C. R., Ivanovska, I. L., Swift, J., and Discher, D. E. (2016) Nuclear lamins in cancer, *Cell. Mol. Bioeng.*, **9**, 258-267, doi: 10.1007/s12195-016-0437-8.
26. Swift, J., Ivanovska, I. L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P. C. D. P., et al. (2013) Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation, *Science*, **341**, 1240104, doi: 10.1126/science.1240104.
27. Pajerowski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J., and Discher, D. E. (2007) Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15619-24, doi: 10.1073/pnas.0702576104.
28. Lammerding, J., Fong, L. G., Ji, J. Y., Reue, K., Stewart, C. L., et al. (2006) Lamins A and C but Not Lamin B1 regulate nuclear mechanics, *J. Biol. Chem.*, **281**, 25768-25780, doi: 10.1074/jbc.M513511200.
29. Jung, H.J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A. P., Davies, B. S. J., et al. (2012) Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E423-31, doi: 10.1073/pnas.1111780109.
30. Constantinescu, D., Gray, H. L., Sammak, P. J., Schatten, G. P., and Csoka, A. B. (2006) Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation, *Stem Cells*, **24**, 177-185, doi: 10.1634/stemcells.2004-0159.
  31. Pekovic, V., and Hutchison, C. J. (2008) Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches, *J. Anat.*, **213**, 5-25, doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00928.x.
  32. Mounkes, L.C., Kozlov, S., Hernandez, L., Sullivan, T., and Stewart, C. L. (2003) A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins, *Nature*, **423**, 298-301, doi: 10.1038/nature01631.
  33. Prather, R. S., Kubiak, J., Maul, G. G., First, N. L., and Schatten, G. (1991) The expression of nuclear lamin A and C epitopes is regulated by the developmental stage of the cytoplasm in mouse oocytes or embryos, *J. Exp. Zool.*, **257**, 110-114, doi: 10.1002/jez.1402570114.
  34. Rober, R.A., Sauter, H., Weber, K., and Osborn, M. (1990) Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells, *J. Cell Sci.*, **95**, 587-598.
  35. Schäpe, J., Prauße, S., Radmacher, M., and Stick, R. (2009) Influence of lamin A on the mechanical properties of amphibian oocyte nuclei measured by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, **96**, 4319-4325, doi: 10.1016/j.bpj.2009.02.048.
  36. Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J.-W., Spinler, K. R., et al. (2014) Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival, *J. Cell Biol.*, **204**, 669-682, doi: 10.1083/jcb.201308029.
  37. Rowat, A. C., Jaalouk, D. E., Zwirger, M., Ung, W. L., Eydelnant, I. A., et al. (2013) Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions, *J. Biol. Chem.*, **288**, 8610-8618, doi: 10.1074/jbc.M112.441535.
  38. Shah, P., Hobson, C. M., Cheng, S., Colville, M. J., Paszek, M. J., et al. (2021) Nuclear deformation causes DNA damage by increasing replication stress, *Curr. Biol.*, **31**, 753-765, doi: 10.1016/j.cub.2020.11.037.
  39. Olins, A. L., Herrmann, H., Lichter, P., Kratzmeier, M., Doenecke, D., and Olins, D. E. (2001) Nuclear Envelope and chromatin compositional differences comparing undifferentiated and retinoic acid- and phorbol ester-treated HL-60 cells, *Exp. Cell Res.*, **268**, 115-127, doi: 10.1006/excr.2001.5269.
  40. Pillay, J., den Braber, I., Vriskoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., et al. (2010) *In vivo* labeling with  $2H_2O$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days, *Blood*, **116**, 625-627, doi: 10.1182/blood-2010-01-259028.
  41. Shin, J.W., Swift, J., Ivanovska, I., Spinler, K. R., Buxboim, A., and Discher, D. E. (2013) Mechanobiology of bone marrow stem cells: from myosin-II forces to compliance of matrix and nucleus in cell forms and fates, *Differentiation*, **86**, 77-86, doi: 10.1016/j.diff.2013.05.001.
  42. Kittisopikul, M., Shimi, T., Tatli, M., Tran, J. R., Zheng, Y., et al. (2021) Computational analyses reveal spatial relationships between nuclear pore complexes and specific lamins, *J. Cell Biol.*, **220**, e202007082, doi: 10.1083/JCB.202007082.
  43. Moir, R. D., Spann, T. P., Herrmann, H., and Goldman, R. D. (2000) Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication, *J. Cell Biol.*, **149**, 1179-91, doi: 10.1083/jcb.149.6.1179.
  44. Vergnes, L., Péterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G., and Reue, K. (2004) Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10428-33, doi: 10.1073/pnas.0401424101.
  45. Coffinier, C., Jung, H. J., Nobumori, C., Chang, S., Tu, Y., et al. (2011) Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4461-4703, doi: 10.1091/mbc.E11-06-0504.
  46. Chen, N. Y., Yang, Y., Weston, T. A., Belling, J. N., Heizer, P., et al. (2019) An absence of lamin B1 in migrating neurons causes nuclear membrane ruptures and cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 25870-25879, doi: 10.1073/pnas.1917225116.
  47. Banigan, E. J., Stephens, A. D., Marko, J. F. (2017) Mechanics and buckling of biopolymeric shells and cell nuclei, *Biophys. J.*, **113**, 1654-63, doi: 10.1016/j.bpj.2017.08.034.
  48. Ou, H. D., Phan, S., Deerinck, T. J., Thor, A., Ellisman, M. H., and O'Shea, C. C. (2017) ChromEMT: visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells, *Science*, **357**, eaag0025, doi: 10.1126/science.aag0025.
  49. Bouck, D. C., and Bloom, K. (2007) Pericentric Chromatin is an elastic component of the mitotic spindle, *Curr. Biol.*, **17**, 741-748, doi: 10.1016/j.cub.2007.03.033.
  50. Stephens, A. D., Banigan, E. J., Adam, S. A., Goldman, R. D., and Marko, J. F. (2017) Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus, *Mol. Biol. Cell*, **28**, 1984-1996, doi: 10.1091/mbc.E16-09-0653.
  51. Booth-Gauthier, E. A., Alcoser, T. A., Yang, G., and Dahl, K. N. (2012) Force-induced changes in subnuclear movement and rheology, *Biophys. J.*, **103**, 2423-2431, doi: 10.1016/j.bpj.2012.10.039.
  52. Chalut, K. J., Höpfner, M., Lautenschläger, F., Boyde, L., Chan, C. J., et al. (2012) Chromatin decondensation and nuclear softening accompany Nanog downregulation in embryonic stem cells, *Biophys. J.*, **103**, 2060-2070, doi: 10.1016/j.bpj.2012.10.015.
  53. Spagnol, S. T., and Dahl, K. N. (2016) Spatially resolved quantification of chromatin condensation through differential local rheology in cell nuclei fluorescence lifetime imaging, *PLoS One*, **11**, e0146244, doi: 10.1371/journal.pone.0146244.
  54. Gerace, L., and Tapia, O. (2018) Messages from the voices within: regulation of signaling by proteins of the nuclear lamina, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **52**, 14-21, doi: 10.1016/j.cceb.2017.12.009.
  55. Koch, A. J., and Holaska, J. M. (2014) Emerin in health and disease, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **29**, 95-106, doi: 10.1016/j.semcdb.2013.12.008.
  56. Bouzid, T., Kim, E., Riehl, B. D., Esfahani, A. M., Rosenbohm, J., et al. (2019) The LINC complex, mechanotransduction, and mesenchymal stem cell function and fate, *J. Biol. Eng.*, **13**, 1-12, doi: 10.1186/s13036-019-0197-9.
  57. Buxboim, A., Irianto, J., Swift, J., Athirasala, A., Shin, J.-W., et al. (2017) Coordinated increase of nuclear tension and lamin-A with matrix stiffness outcompetes lamin-B receptor that favors soft tissue phenotypes, *Mol. Biol. Cell*, **28**, 3333-3348, doi: 10.1091/mbc.E17-06-0393.
  58. Wu, D., Flannery, A.R., Cai, H., Ko, E., and Cao, K. (2014) Nuclear localization signal deletion mutants of lamin A and progerin reveal insights into lamin A processing and emerin targeting, *Nucleus*, **5**, 66-74, doi: 10.4161/nucl.28068.
  59. Eisch, V., Lu, X., Gabriel, D., and Djabali, K. (2016) Progerin impairs chromosome maintenance by depleting CENP-F from metaphase kinetochores in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts, *Oncotarget*, **7**, 24700-24718, doi: 10.18632/oncotarget.8267.

60. Chen, Z.-J., Wang, W.-P., Chen, Y.-C., Wang, J.-Y., Lin, W.-H., et al. (2014) Dysregulated interactions between lamin A and SUN1 induce abnormalities in the nuclear envelope and endoplasmic reticulum in progeric laminopathies, *J. Cell Sci.*, **127**, 1792-1804, doi: 10.1242/jcs.139683.
61. Chang, W., Wang, Y., Luxton, G. W. G., Östlund, C., Worman, H. J., and Gundersen, G. G. (2019) Imbalanced nucleocytoskeletal connections create common polarity defects in progeria and physiological aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 3578-3583, doi: 10.1073/pnas.1809683116.
62. Subramanian, G., Chaudhury, P., Malu, K., Fowler, S., Manmode, R., et al. (2012) Lamin B receptor regulates the growth and maturation of myeloid progenitors via its sterol reductase domain: implications for cholesterol biosynthesis in regulating myelopoiesis, *J. Immunol.*, **188**, 85-102, doi: 10.4049/jimmunol.1003804.
63. Solovei, I., Wang, A. S., Thanisch, K., Schmidt, C. S., Krebs, S., et al. (2013) LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation, *Cell*, **152**, 584-598, doi: 10.1016/j.cell.2013.01.009.
64. Zink, D., Fischer, A. H., Nickerson, J. A. (2004) Nuclear structure in cancer cells, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 677-87, doi: 10.1038/nrc1430.
65. Hudson, M.E., Pozdnyakova, I., Haines, K., Mor, G., and Snyder, M. (2007) Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17494-9, doi: 10.1073/pnas.0708572104.
66. Tilli, C. M. L. J., Ramaekers, F. C. S., Broers, J. L. V., Hutchison, C. J., and Neumann, H. A. M. (2003) Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma, *Br. J. Dermatol.*, **148**, 102-109, doi: 10.1046/j.1365-2133.2003.05026.x.
67. Willis, N. D., Cox, T. R., Rahman-Casañs, S. F., Smits, K., Przyborski, S. A., et al. (2008) Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer, *PLoS One*, **3**, e2988, doi: 10.1371/journal.pone.0002988.
68. Venables, R. S., McLean, S., Luny, D., Moteleb, E., Morley, S., et al. (2001) Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin, *Br. J. Cancer*, **84**, 512-519, doi: 10.1054/bjoc.2000.1632.
69. Agrelo, R., Setien, F., Espada, J., Artiga, M. J., Rodriguez, M., et al. (2005) Inactivation of the lamin A/C gene by cpg island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-Cell lymphoma, *J. Clin. Oncol.*, **23**, 3940-3947, doi: 10.1200/JCO.2005.11.650.
70. Alhudiri, I. M., Nolan, C. C., Ellis, I. O., Elzagheid, A., Rakha, E. A., et al. (2019) Expression of Lamin A/C in early-stage breast cancer and its prognostic value, *Breast Cancer Res. Treat.*, **174**, 661-8, doi: 10.1007/s10549-018-05092-w.
71. Moss, S. F., Krivosheyev, V., de Souza, A., Chin, K., Gaetz, H. P., et al. (1999) Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms, *Gut*, **45**, 723-729, doi: 10.1136/gut.45.5.723.
72. Broers, J. L. V., Peeters, E. A. G., Kuipers, H. J. H., Endert, J., Bouten, C. V. C., et al. (2004) Decreased mechanical stiffness in LMNA<sup>-/-</sup> cells is caused by defective nucleocytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies, *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2567-2580, doi: 10.1093/hmg/ddh295.
73. Wong, K.-F., and Luk, J. M. (2012) in *Liver Proteomics*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 295-310.
74. Belt, E. J. T., Fijneman, R. J. A., van den Berg, E. G., Bril, H., Delis-van Diemen, P. M., et al. (2011) Loss of lamin A/C expression in stage II and III colon cancer is associated with disease recurrence, *Eur. J. Cancer*, **47**, 1837-1845, doi: 10.1016/j.ejca.2011.04.025.
75. Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2011) Nuclear mechanics during cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 55-64, doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.015.
76. Van Helvert, S., Storm, C., Friedl, P. (2018) Mechanoreciprocity in cell migration, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 8-20, doi: 10.1038/s41556-017-0012-0.
77. Kaspi, E., Frankel, D., Guinde, J., Perrin, S., Laroumagne, S., et al. (2017) Low lamin A expression in lung adenocarcinoma cells from pleural effusions is a pejorative factor associated with high number of metastatic sites and poor performance status, *PLoS One*, **12**, e0183136, doi: 10.1371/journal.pone.0183136.
78. Khan, Z. S., Santos, J. M., and Hussain, F. (2018) Aggressive prostate cancer cell nuclei have reduced stiffness, *Biomicrofluidics*, **12**, 014102, doi: 10.1063/1.5019728.
79. Wang, Y., Jiang, J., He, L., Gong, G., and Wu, X. (2019) Effect of lamin-A expression on migration and nuclear stability of ovarian cancer cells, *Gynecol. Oncol.*, **152**, 166-176, doi: 10.1016/j.ygyno.2018.10.030.
80. Mitchell, M. J., Denais, C., Chan, M. F., Wang, Z., Lammerding, J., and King, M. R. (2015) Lamin A/C deficiency reduces circulating tumor cell resistance to fluid shear stress, *Am. J. Physiol. Physiol.*, **309**, C736-746, doi: 10.1152/ajpcell.00050.2015.
81. Roncato, F., Regev, O., Feigelson, S. W., Yadav, S. K., Kaczmarczyk, L., et al. (2021) Reduced lamin A/C Does not facilitate cancer cell transendothelial migration but compromises lung metastasis, *Cancers (Basel)*, **13**, 2383, doi: 10.3390/cancers13102383.
82. Jia, Y., Vong, J. S.-L., Asafova, A., Garvalov, B. K., Caputo, L., et al. (2019) Lamin B1 loss promotes lung cancer development and metastasis by epigenetic derepression of RET, *J. Exp. Med.*, **216**, 1377-1395, doi: 10.1084/jem.20181394.
83. Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., et al. (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions, *Nature*, **453**, 948-951, doi: 10.1038/nature06947.
84. Shah, P. P., Donahue, G., Otte, G. L., Capell, B. C., Nelson, D. M., et al. (2013) Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape, *Genes Dev.*, **27**, 1787-99, doi: 10.1101/gad.223834.113.
85. Nguyen, A. V., Nyberg, K. D., Scott, M. B., Welsh, A. M., Nguyen, A. H., et al. (2016) Stiffness of pancreatic cancer cells is associated with increased invasive potential, *Integr. Biol.*, **8**, 1232-1245, doi: 10.1039/C6IB00135A.
86. Kong, L., Schäfer, G., Bu, H., Zhang, Y., Zhang, Y., and Klocker, H. (2012) Lamin A/C protein is overexpressed in tissue-invasive prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth, migration and invasion through the PI3K/AKT/PTEN pathway, *Carcinogenesis*, **33**, 751-759, doi: 10.1093/carcin/bgs022.
87. Zhang, X., and Lv, Y. (2017) Suspension state increases reattachment of breast cancer cells by up-regulating lamin A/C, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1864**, 2272-2282, doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.09.006.
88. Li, L., Du, Y., Kong, X., Li, Z., Jia, Z., et al. (2013) Lamin B1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 4651-4661, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3630.
89. Liu, L., Wang, J., Shi, L., Zhang, W., Du, X., et al. (2013)  $\beta$ -Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression, *Phytomedicine*, **20**, 512-20, doi: 10.1016/j.phymed.2012.12.008.
90. Fracchia, A., Asraf, T., Salmon-Divon, M., and Gerlitz, G. (2020) Increased lamin B1 levels promote cell migration by altering perinuclear actin organization, *Cells*, **9**, 2161, doi: 10.3390/cells9102161.

91. Bérout, C., Collod-Bérout, G., Boileau, C., Soussi, T., and Junien, C. (2000) UMD (Universal Mutation Database): a generic software to build and analyze locus-specific databases, *Hum. Mutat.*, **15**, 86-94, doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<86::AID-HUMU16>3.0.CO;2-4.
92. Padiath, Q.S., Saigoh, K., Schiffmann, R., Asahara, H., Yamada, T., et al. (2006) Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy, *Nat. Genet.*, **38**, 1114-1123, doi: 10.1038/ng1872.
93. Hegele, R. A., Cao, H., Liu, D. M., Costain, G. A., Charlton-Menys, V., et al. (2006) Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy, *Am. J. Hum. Genet.*, **79**, 383-389, doi: 10.1086/505885.
94. Cristofoli, F., Moss, T., Moore, H. W., Devriendt, K., Flanagan-Steet, H., et al. (2020) *De novo* variants in LMNB1 cause pronounced syndromic microcephaly and disruption of nuclear envelope integrity, *Am. J. Hum. Genet.*, **107**, 753-762, doi: 10.1016/j.ajhg.2020.08.015.
95. Östlund, C., Chang, W., Gundersen, G. G., and Worman, H. J. (2019) Pathogenic mutations in genes encoding nuclear envelope proteins and defective nucleocytoplasmic connections, *Exp. Biol. Med.*, **244**, 1333-1344, doi: 10.1177/1535370219862243.
96. Novelli, G., Muchir, A., Sangiulio, F., Helbling-Leclerc, A., D'Apice, M. R., et al. (2002) Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding Lamin A/C, *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 426-431, doi: 10.1086/341908.
97. Vigouroux, C., Magré, J., Vantyghem, M. C., Bourut, C., Lascos, O., et al. (2000) Lamin A/C gene: Sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipodystrophy, *Diabetes*, **49**, 1958-1962, doi: 10.2337/diabetes.49.11.1958.
98. Caux, F., Dubosclard, E., Lascos, O., Buendia, B., Chazouillères, O., et al. (2003) A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins a and c with generalized lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 1006-1013, doi: 10.1210/jc.2002-021506.
99. Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., et al. (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1715-1724, doi: 10.1056/NEJM199912023412302.
100. Hamadouche, T., Poitelon, Y., Genin, E., Chaouch, M., Tazir, M., et al. (2008) Founder effect and estimation of the age of the c.892C>T (p.Arg298Cys) mutation in LMNA associated to Charcot-Marie-Tooth subtype CMT2B1 in families from North Western Africa, *Ann. Hum. Genet.*, **72**, 590-597, doi: 10.1111/j.1469-1809.2008.00456.x.
101. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., et al. (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nature*, **423**, 293-298, doi: 10.1038/nature01629.
102. De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., et al. (2003) Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria, *Science*, **300**, 2055, doi: 10.1126/science.1084125.
103. Agarwal, A. K. (2003) Zinc metalloproteinase, ZMP-STE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia, *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1995-2001, doi: 10.1093/hmg/ddg213.
104. Smigiel, R., Jakubiak, A., Esteves-Vieira, V., Szela, K., Halon, A., et al. (2010) Novel frameshifting mutations of the ZMPSTE24 gene in two siblings affected with restrictive dermopathy and review of the mutations described in the literature, *Am. J. Med. Genet. Part A*, **152**, 447-452, doi: 10.1002/ajmg.a.33221.
105. Navarro, C.L., Cau, P., and Lévy, N. (2006) Molecular bases of progeroid syndromes, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, R151-61, doi: 10.1093/hmg/ddl214.
106. Chong, J. X., Ouwenga, R., Anderson, R. L., Waggoner, D. J., and Ober, C. (2012) A population-based study of autosomal-recessive disease-causing mutations in a founder population, *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 608-620, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.007.
107. Khanna, P., Opitz, J. M., and Gilbert-Barnes, E. (2008) Restrictive dermopathy: report and review, *Fetal Pediatr. Pathol.*, **27**, 105-118, doi: 10.1080/15513810802077586.
108. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., et al. (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8963-8968, doi: 10.1073/pnas.0402943101.
109. Scaffidi, P., and Misteli, T. (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging, *Science*, **312**, 1059-1063, doi: 10.1126/science.1127168.
110. Davidson, P. M., and Lammerding, J. (2014) Broken nuclei – lamins, nuclear mechanics, and disease, *Trends Cell Biol.*, **24**, 247-56, doi: 10.1016/j.tcb.2013.11.004.
111. Worman, H. J., and Schirmer, E. C. (2015) Nuclear membrane diversity: underlying tissue-specific pathologies in disease? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **34**, 101-112, doi: 10.1016/j.ceb.2015.06.003.
112. Osmanagic-Myers, S., and Foisner, R. (2019) The structural and gene expression hypotheses in laminopathic diseases – not so different after all, *Mol. Biol. Cell*, **30**, 1786-1790, doi: 10.1091/mbc.E18-10-0672.
113. Lutz, R. J., Trujillo, M. A., Denham, K. S., Wenger, L., and Sinensky, M. (1992) Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3000-3004, doi: 10.1073/pnas.89.7.3000.
114. Black, S. D. (1992) Development of hydrophobicity parameters for prenylated proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1437-1442, doi: 10.1016/S0006-291X(05)81567-0.
115. Hu, X.-T., Song, H.-C., Yu, H., Wu, Z.-C., Liu, X.-G., and Chen, W.-C. (2020) Overexpression of progerin results in impaired proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells, *Oncotargets. Ther.*, **13**, 2629-2642, doi: 10.2147/OTT.S237016.
116. Booth-Gauthier, E. A., Du, V., Ghibaud, M., Rape, A. D., Dahl, K. N., and Ladoux, B. (2013) Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters nuclear shape and reduces cell motility in three dimensional model substrates, *Integr. Biol.*, **5**, 569, doi: 10.1039/c3ib20231c.
117. Ovsianikova, N., Lavrushkina, S., Yudina, A., Strelkova, O., Zhironkina, O., and Kireev, I. (2019) The role of the nuclear lamina in cell migration: the connection with aging and metastasis, *Biopolym. Cell*, **35**, 227-228, doi: 10.7124/bc.0009F2.
118. De Vos, W. H., Houben, F., Kamps, M., Malhas, A., Verheyen, F., et al. (2011) Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4175-4186, doi: 10.1093/hmg/ddr344.
119. Hatch, E. M., and Hetzer, M. W. (2016) Nuclear envelope rupture is induced by actin-based nucleus confinement, *J. Cell Biol.*, **215**, 27-36, doi: 10.1083/jcb.201603053.
120. Cho, S., Abbas, A., Irianto, J., Ivanovska, I. L., Xia, Y., et al. (2018) Progerin phosphorylation in interphase is lower and less mechanosensitive than lamin-A,C in iPS-derived mesenchymal stem cells, *Nucleus*, **9**, 235-250, doi: 10.1080/19491034.2018.1460185.

121. Gordon, L. B., Rothman, F. G., López-Otín, C., and Misteli, T. (2014) Progeria: a paradigm for translational medicine, *Cell*, **156**, 400-407, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.028.
122. Pfeifer, C. R., Xia, Y., Zhu, K., Liu, D., Irianto, J., et al. (2018) Constricted migration increases DNA damage and independently represses cell cycle, *Mol. Biol. Cell*, **29**, 1948-1962, doi: 10.1091/mbc.E18-02-0079.
123. Fernandez, P., Scaffidi, P., Markert, E., Lee, J.-H., Rane, S., and Misteli, T. (2014) Transformation resistance in a premature aging disorder identifies a tumor-protective function of BRD4, *Cell Rep.*, **9**, 248-260, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.069.
124. Clarke, S. G. (2007) HIV protease inhibitors and nuclear lamin processing: Getting the right bells and whistles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13857-13858, doi: 10.1073/pnas.0706529104.
125. Coffinier, C., Hudon, S. E., Lee, R., Farber, E. A., Nobumori, C., et al. (2008) A Potent HIV protease inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in cells, *J. Biol. Chem.*, **283**, 9797-9804, doi: 10.1074/jbc.M709629200.
126. Liu, Q., Kim, D. I., Syme, J., LuValle, P., Burke, B., and Roux, K. J. (2010) Dynamics of lamin-A processing following precursor accumulation, *PLoS One*, **5**, e10874, doi: 10.1371/journal.pone.0010874.

## LAMIN A AS A DETERMINANT OF MECHANICAL PROPERTIES OF THE NUCLEUS IN HEALTH AND DISEASE

### Review

**N. L. Ovsiannikova<sup>1,2\*</sup>, S. V. Lavrushkina<sup>1,2</sup>, A. V. Ivanova<sup>3</sup>, L. M. Mazina<sup>3</sup>,  
O. A. Zhironkina<sup>1</sup>, and I. I. Kireev<sup>1,3,4</sup>**

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: nat.ovs94@gmail.com*

<sup>2</sup> *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician Kulakov, 117198 Moscow, Russia*

Metastases are one of the main factors associated with poor prognosis in the development of oncological disease. However, the spread of cancer cells can be inhibited *via* the regulation of nuclear elasticity. The nucleus being the biggest and stiffest cellular compartment determines the mechanical properties of the cell and hence could prevent cell migration through a three-dimensional extracellular matrix. At the same time, the nuclear rigidity is maintained basically by the nuclear lamina, a meshwork embedded in the INM and formed by A and B type lamins. Here we review the role of nuclear lamina in cell mobility and carcinogenesis. Furthermore, we observe a possible way of fighting metastasis through the alteration of nuclear lamina composition and nuclear plasticity.

**Keywords:** nuclear lamina, lamin A, ZMPSTE24, chromatin, cell migration, laminopathies, aging, metastasis

УДК 577.21

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ микроРНК В ГИПОТАЛАМУСЕ ОВЕЦ КАЗАХСКОЙ ПОРОДЫ, ПОМЕЩЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫЕ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

© 2021 Н. Yang<sup>1,2\*\*</sup>, L. Fu<sup>3#</sup>, Q. Luo<sup>1#</sup>, L. Li<sup>1</sup>, F. Zheng<sup>1</sup>,  
X. Liu<sup>4</sup>, Z. Zhao<sup>4</sup>, Z. Wang<sup>1</sup>, and H. Xu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Southwest University, 404100 Chongqing, China;  
e-mail: yh20183007@swu.edu.cn, 280111842@qq.com

<sup>2</sup> Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, 404100 Chongqing, China

<sup>3</sup> Research Institute of Herbivorous Livestock, Chongqing Academy of Animal Sciences, 404100 Chongqing, China

<sup>4</sup> College of Animal Science and Technology, Shihezi University, 830000 Xinjiang, China

Поступила в редакцию 25.02.2021

После доработки 06.06.2021

Принята к публикации 21.07.2021

МикроРНК играют важную роль во многих биологических регуляторных процессах, принимая участие в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Тем не менее информация относительно микроРНК, ассоциированных с метаболическими путями, связанными с фотопериодизмом, который определяет сезонную активность животных, весьма ограничена. Для изучения влияния различных фотопериодических условий на экспрессию микроРНК мы разделили овец казахской породы на две группы. В одну группу вошли животные, помещенные в условия длинного фотопериода (LP – long photoperiod; 16L : 8D, 16 ч на свету и 8 ч в темноте). Другую группу составили овцы, находящиеся в условиях короткого фотопериода (SP – short photoperiod; 8L : 16D, 8 ч на свету и 16 ч в темноте), при этом животные также получали дополнительный корм. Далее в этих двух группах мы определили микроРНК и их гены-мишени, имеющие отношение к фотопериодизму. Всего нами было идентифицировано 15 дифференциально экспрессируемых микроРНК, ассоциированных с 310 регуляторными путями, охватывающими фотопериодизм, гормоны репродуктивной системы и питание. Пара miR-136–GNAQ была выбрана для исследования и валидирована как дифференциально экспрессируемая: методом двойной люциферазной детекции было показано, что между miR-136 и GNAQ существует отрицательная обратная связь. При исследовании профиля экспрессии было показано, что экспрессия GNAQ снижена у самок в состоянии эструса как в условиях LP, так и в условиях SP, в то время как повышенная экспрессия GNAQ наблюдалась в условиях LP у самок в период анэструса. Кроме того, при проведении функционального анализа было обнаружено, что в клетках гипоталамуса экспрессия KISS1 и GnRH повышается, а DIO2 и TSHB – снижается, в то время как экспрессия GNAQ оказывается сниженной. Таким образом, пара miR-136–GNAQ может действовать как переключатель в регуляции сезонного эструса (течки) при различных фотопериодических условиях. Полученные результаты дают новую информацию о связи между микроРНК и сезонной регуляцией репродуктивной активности. Кроме того, наша работа позволяет по-новому взглянуть на микроРНК-опосредованные регуляторные механизмы с целью преодоления фотоингибирования у сезонно размножающихся млекопитающих, таких как овцы казахской породы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** микроРНК, гипоталамус, ген-мишень, нейроэндокринная регуляция, обратная связь.

**DOI:** 10.31857/S0320972521100122

### ВВЕДЕНИЕ

Среди млекопитающих большинство племенных животных сохранили физиологические характеристики репродуктивной сезонности. На картину сезонного размножения в норме влияют различные факторы окружающей среды, такие как фотопериод и питание. Фотопери-

од рассматривается как главный фактор, определяющий начало полового сезона у племенных животных в умеренных широтах с сезонным циклом размножения [1–3]. В частности, типичные сезонные вариации характерны для овец казахской породы, разводимых в Китае. В соответствии с фотопериодической синхронизацией половой активности казахские овцы классифицируются как животные короткого дня: именно короткие дни стимулируют, в то время как длинные – тормозят половую актив-

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

ность у представителей этой породы. Следовательно, сезон половой активности у этих овец приходится на короткий фотопериод (с июля по январь), и для него характерна определенная последовательность эстральных сигналов. И наоборот, овцы казахской породы вступают в межэстральный период, когда короткие дни сменяются длинными (с февраля по июнь), что характеризует прекращением половой жизни [4, 5]. Следовательно, репродуктивная способность овец в животноводстве ограничена из-за фотоингибирования.

Учитывая те ограничения, которые накладывает фотопериод на репродуктивные циклы племенных животных, большой интерес для многих исследователей представляют способы преодоления фотоингибирования, ограничивающего период размножения. В начале 1930-х гг. Marshall и его коллеги впервые описали факт изменения сезонной половой активности у овец в зависимости от фотопериода. Более того, выяснилось, что перевозка овец в южное полушарие приводит к смене сезонности периодов размножения на противоположные [6]. С того момента многие исследователи использовали искусственно создаваемую фотопериодичность для изучения фотопериодического контроля сезонного размножения [7–10]. Тем не менее с развитием и усложнением исследовательских подходов в ряде работ на основе полученных данных было высказано предположение, что только лишь с помощью изменения фотопериода трудно достичь полного контроля над сезонными колебаниями способности к размножению и растянуть эстральный период на весь год. Chemineau et al. [11] перевезли сезонно размножающихся овец в условия тропического фотопериода, однако, несмотря на амплитуду фотопериодических изменений, сезонные колебания их производительности не поменялись по сравнению с самками, содержащимися в условиях умеренного фотопериода. Перевезенные овцы продемонстрировали лишь увеличение продолжительности сезона размножения на один месяц и соответствующее сокращение периода анэструса. Ряд научных групп продолжал поиск способов оптимизации или замены вышеупомянутых схем контроля над периодичностью размножения. Так, Estrada-Cortés [12] и Zarazaga [13] с коллегами обнаружили, что сезонный характер репродуктивной активности овец можно модулировать типом кормления. Они показали, что при улучшении питания репродуктивная активность овец начинается раньше и заканчивается позже. Другими исследованиями было дополнительно подтверждено, что оптимальный уровень питательных веществ, получаемый жи-

вотными, может улучшить репродуктивную функцию племенных особей, в то время как недостаток или избыток пищи может существенно подавлять их размножение [14, 15]. Ранее нами было показано, что в период анэструса при повышении качества питания овцы могут снова вступить в репродуктивный цикл [16]. При этом стоит отметить, что соотношение эстральных и анэстральных овец все же было не очень высоким. Тем не менее при неизменных условиях фотопериода, характеризующегося в норме отсутствием размножения, адекватное улучшение питания привело к характерному выраженному эстральному поведению у ряда овец. Таким образом, в этой работе было продемонстрировано не только изменение сроков начала и окончания сезона размножения, но также были представлены свидетельства в пользу того, что предложенный способ может быть более эффективен в достижении круглогодичного воспроизводства у сезонно размножающихся пород. Было бы интересно исследовать, имеют ли овцы в состоянии естественно эструса (в условиях короткого фотопериода) и овцы с индуцированным эструсом в условиях длинного фотопериода и при адекватном питании сходные профили эндокринных гормонов и молекулярный механизм регуляции, в частности, при участии микроРНК и их генов-мишеней.

МикроРНК — это некодирующие эндогенные одноцепочечные небольшие молекулы РНК (sRNA, small RNA) с длиной ~ 22 нуклеотидных остатка (н.о.). Впервые они были описаны в 1993 г. и характеризованы как консервативный класс биологических регуляторов в начале 2000-х гг. [17, 18]. Накопленные данные позволяют предположить, что большое число различных микроРНК экспрессируется и накапливается в репродуктивной оси, включая гипоталамус [19]. Гипоталамус регулирует эндокринную активность млекопитающих и интегрирует сигналы, поступающие из мозга и периферической нервной системы, которые играют основную регуляторную роль в механизме периодичности размножения. Таким образом, для исследования возможного механизма регулирования фотопериодического ингибирования у племенных животных с сезонным воспроизводством с помощью микроРНК мы создали две библиотеки микроРНК гипоталамуса, полученные от животных, помещенных в условия длинного фотопериода (LP — long photoperiod) и короткого фотопериода (SP — short photoperiod) при дополнительном питании. Мы исследовали различия в паттернах экспрессии микроРНК из этих двух библиотек с целью поиска пар микроРНК—мРНК в гипоталамусе овец,

вовлеченных в фотопериодический путь, контролирующей реинициацию сезонного эстрального цикла в нейроэндокринной системе. Получение такой информации могло бы обеспечить глубокое понимание механизма молекулярной модуляции инициации и окончания эстрального периода у животных с сезонностью размножения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные и воздействие фотопериода.** Овцы казахской породы в Китае являются типичными представителями породы овец с сезонностью размножения, которая в условиях LP находится в продолжительном анэстральном периоде. В настоящей работе 36 здоровых овец казахской породы со сходными показателями массы тела (отклонения в весе не превышали 5%) были отобраны из общего места кормления и пронумерованы; они получали дополнительное питание в количестве 0,3 кг/овцу со следующим составом: общий белок — 18,0%, сырая клетчатка — 11,0%, зола — 11,0%, общий жир — 2,0%, кальций — 0,8–1,5%, фосфор — 0,4%, а также люцерну в количестве 1,5 кг/овцу. Овцы содержались в сарае экспериментального центра Университета Шихэцзы (Китай) [16]. Все овцы имели неограниченный доступ к воде. На протяжении всего эксперимента средняя температура в помещении поддерживалась на уровне 15–18 °С. Для создания условий двух различных фотопериодов овцы были случайным образом разделены на две группы: контрольные овцы размещались в блоке сарая в условиях LP (16 ч на свету и 8 ч в темноте) на протяжении 12 недель, в то время как экспериментальные животные размещались в другом блоке того же сарая в условиях SP (8 ч на свету и 16 ч в темноте) на протяжении тех же 12 недель. Для обеспечения фиксированной продолжительности светового дня применяли комбинированное искусственное и естественное освещение. На протяжении всего эксперимента через случайные временные интервалы осуществляли мониторинг интенсивности света в период дополнительного освещения для обеих групп животных. По окончании эксперимента все животные были идентифицированы и гуманным образом умерщвлены путем инъекции пентобарбитала натрия. Сбор образцов был проведен обученным персоналом и сертифицированными ветеринарами в соответствии с протоколами по уходу за животными Первой больницы медицинского колледжа университета Шихэцзы (номер регистрации разрешения A2018-114-01).

**Мониторинг эструса, определение уровня гормонов и сбор образцов ткани.** У каждой овцы контролировали эструс дважды в день, вводя барана в загон. В другое время барана держали в соседних загонах, чтобы избежать его влияния на эстральное поведение овцы [15]. За первый день эстрального цикла принимали дату, когда овца впервые приняла «дразнящего» барана, наряду с появлением отека вульвы и обильным выделением слизи. Динамические изменения в фолликулах фиксировали путем определения содержания гормонов в сыворотке крови. С этой целью у животных производили забор крови из яремной вены, измерения проводили каждое утро. Образцы сыворотки крови собирали и хранили при –20 °С до определения содержания прогестерона ( $P_4$ ) и эстрадиола ( $E_2$ ). Уровни стероидов определяли с помощью наборов для проведения ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; «Blue Gene Biotech», Китай). Чувствительность метода составила 0,2 нг/мл для  $P_4$  и 1,0 пкг/мл для  $E_2$ . Затем были отобраны три овцы, находящиеся в состоянии индуцированного эструса в условиях LP. Для выделения гипоталамуса они были умерщвлены гуманным образом. Полученную ткань использовали для конструирования библиотеки микроРНК, обозначенной как «HEN». Аналогично, три другие овцы в естественном эстральном состоянии при нахождении в условиях SP были гуманно умерщвлены для выделения гипоталамуса, который был далее использован для конструирования библиотеки микроРНК, обозначенной как «HEB». Еще три овцы в анэстральном состоянии, находящиеся в условиях LP, были гуманно умерщвлены с целью выделения гипоталамуса и определения профиля тканевой экспрессии (сокращенное название библиотеки — «HNN»). Все образцы сразу замораживали в жидком азоте до проведения экстракции тотальной РНК.

**Экстракция РНК, секвенирование микроРНК и биоинформатический анализ.** Препараты тотальной РНК из гипоталамуса шести овец казахской породы в состоянии эструса (по три овцы, содержащиеся в условиях LP и SP) получали путем экстракции с использованием хлороформа, изопропанола и 70%-ного этанола. После определения целостности РНК (RIN — total RNA integrity numbers) и подтверждения качества препаратов, низкомолекулярные РНК разделяли с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (PAGE — polyacrylamide gel electrophoresis). Собирали молекулы РНК с длиной от 18 до 30 н.о. Продукты лигировали с использованием коммерческих адаптерных молекул к 3'- и 5'-концам при предпочтительной температуре и амплифицировали с помощью

ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction). Для получения достаточных количеств продуктов был использован метод ПЦР. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле и затем растворяли в этидиум бромиде (EB – ethidium bromide). Для характеристики эстрального состояния овец при различных условиях, LP и SP, были сконструированы две библиотеки. Для их анализа были использованы системы Agilent 2100 Bioanalyzer и ABI StepOnePlus RealTime PCR System, затем образцы были секвенированы на платформе Illumina HiSeq 2500 («Beijing Genomics Institute», Китай).

После очистки от адаптерных последовательностей и примесей чистые риды были проанализированы. Тэги были картированы на геном ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_002742125.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002742125.1)) с помощью программы Bowtie, для анализа экспрессии и распределения было произведено выравнивание с помощью BLAST (basic local alignment search tool) с использованием баз данных GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и Rfam (<http://rfam.janelia.org/>) с целью скрининга и удаления повторов и тэгов, ассоциированных с рРНК, scРНК (малая цитоплазматическая РНК), snoРНК (малая ядрышковая РНК), snРНК (малая ядерная РНК) и тРНК. Затем оставшиеся риды были проанализированы с использованием базы данных Sanger miRBase (Ver. 21.0) для идентификации уже известных микроРНК. Предсказание новых микроРНК основывалось на малых РНК (sRNA), которые были картированы на участках антисмысловых экзонов, интронов или межгенных участков генома и не были картированы на какие-либо другие РНК. Затем для предсказания генов-мишеней были использованы программы TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) и RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/RNAhybrid/>). Базы данных GO (онтология генов, <http://www.geneontology.org/>) и KEGG были использованы для определения роли этих генов в биологических процессах и анализа ассоциированных с ними метаболических или сигнальных путей. Гены с коэффициентом ложного обнаружения (FDR – false discovery rate)  $\leq 0,05$  рассматривались как вероятные кандидаты в гены-мишени.

**Количественная ПЦР в реальном времени (qPCR – Real-time quantitative PCR).** МикроРНК и мРНК были обратно транскрибированы в соответствующие кДНК с помощью наборов miRcute microRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit («TianGen», Китай) и PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser («Takara», Япония) соответ-

ственно. В качестве внутреннего эндогенного контроля была выбрана РНК U6. Все праймеры были сконструированы с помощью программы Primer-BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Полученные праймеры для микроРНК и U6 представлены в табл. S1 в Приложении. Относительные уровни экспрессии рассчитаны в виде  $2^{-\Delta C_t}$  ( $\Delta C_t = C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{control}}}$ ). ПЦР в реальном времени проводили трижды для каждой реакции на приборе Mx 3000p real-time qPCR system («Applied Biosystems», США) с использованием набора SYBR Green Realtime PCR Mix («TianGen»).

**Валидация на основе двойной люциферазной репортерной системы.** Для амплификации 3'-нотранслируемых участков (3'-UTR, содержащие сайты связывания микроРНК) кандидатов в гены-мишени в гипоталамусе использовали пары праймеров с различными сайтами рестрикции (табл. S2, Приложение). Затем проводили рекомбинацию с вектором psiCHECK-2 Dual-Luciferase microRNA Target Expression Vector («TianGen») в соответствии с инструкциями производителя. После проведения проверки с помощью расщепления ферментами и секвенирования репортерные плазмиды psiCHECKTM-2 с люциферазой светлячка и последовательностями 3'-UTR кандидата в гены-мишени (GNAQ) дикого (WT) или мутантного (MU) типа были временно котрансфицированы в клетки HeLa вместе с пустым вектором [20], миметиком miR-136 или миметиком отрицательного контроля и репортерным геном люциферазы Renilla для нормализации («RiboBio», Китай). Экспериментальные образцы были поделены на шесть групп: чистый контроль (BC, без обработки), нормальный контроль (NVC, трансфицированные пустым вектором), WT (котрансфицированные миметиком miR-136 и GNAQ), WT+NC (котрансфицированные миметиком отрицательного контроля miR-136 и GNAQ), MU (котрансфицированные миметиком miR-136 и мутированным GNAQ) и MU+NC (котрансфицированные миметиком отрицательной miR-136 и мутированным GNAQ). После 48 ч культивирования клеток в образцах измеряли люциферазную активность с помощью набора Dual-Luciferase Reporter Assay System («Promega», США) на люминометре Smart Line TL Tube Luminometer («Titertek Berthold», Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Каждый эксперимент по котрансфекции выполняли три раза.

**Проверка взаимодействий в клетках-мишенях между генами-мишенями микроРНК и генами, ассоциированными с эстральным циклом.** Для определения биологической функции GNAQ в клет-

ках гипоталамуса мы провели эксперименты по трансфекции микроРНК с использованием miR-136, в том числе с группой миметиков miR-136 и группой ВС в качестве отрицательного контроля. Эксперименты были выполнены на культуре нейронов гипоталамуса, полученных от эмбрионов овец [21]. После 48 ч культивирования получали экстракты тотальной РНК клеток гипоталамуса как описано выше. Изменения в генах, ассоциированных с фотопериодом и сезонным эстральным циклом, определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Все эксперименты проводили по три раза с тремя повторами для каждого образца. Последовательности праймеров для целевых и контрольных ( $\beta$ -актин) генов представлены в Табл. S3 Приложения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Анализ степени эстральности и гормонального профиля в условиях LP и SP.** На основании морфологических, поведенческих и эндокринных данных мы определили, что все овцы в группе SP демонстрировали нормальное эстральное поведение. При этом доля овец в состоянии эструса была выше в условиях LP (10/18) по сравнению с SP. Кроме того, профили гормонов были сходными в условиях LP и SP, не было обнаружено значительных различий в уровнях гормонов между группами с различными фотопериодами ( $p > 0,05$ ). На основании данных по  $P_4$  и  $E_2$  (рис. 1) продолжительность эстрального цикла овец казахской породы характеризовалась длиной 18–20 дней. Овцы вступили в состояние эструса на 17-й день нашего тестового эстрального цикла. Уровни  $E_2$  достигали пиковых значений ( $E_2 > 800$  пкг/мл) на следующий день, в то время как концентрации  $P_4$  находились на более низком уровне ( $P_4 < 1,0$  нг/мл). Для определения первого дня эстрального цикла овцы все эксперименты были выполнены по три раза. Образцы, полученные в начале эстрального состояния, были использованы для секвенирования микроРНК.

**Профили экспрессии микроРНК в гипоталамусе овец.** Образцы РНК со значением целостности РНК в диапазоне от 7,0 до 9,3 были отобраны для конструирования вышеупомянутых библиотек (см. рис. S1 в Приложении). Распределение результатов секвенирования в библиотеке HEN в сравнении с НЕВ показано в табл. S4 в Приложении. При секвенировании библиотек и анализе полученных данных нами были идентифицированы 493 микроРНК, включая 145 известных и 348 предсказанных новых микроРНК. В соответ-

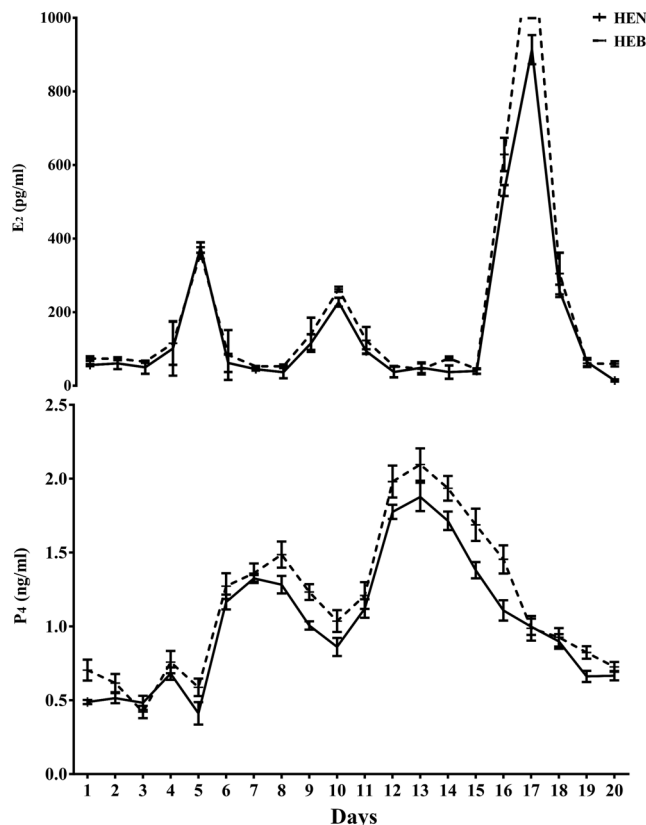


**Рис. 1.** Концентрации эстрогена ( $E_2$ ) и прогестерона ( $P_4$ ) в течение эстрального цикла овцы в условиях длинного фотопериода (LP) и короткого фотопериода (SP). Каждая точка представляет среднее значение концентрации гормона. Образцы крови отбирали каждое утро в течение эстрального цикла овцы. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM)

ствии с принятой системой установления семейства микроРНК (the miRbase family organization) эти микроРНК были классифицированы в 51 семейство. В двух библиотеках было проанализировано распределение длин различных типов РНК (рис. S2, Приложение) и точность определения нуклеотидов (рис. S3, Приложение). Для сравнения частот конкретной микроРНК в каждой группе (рис. 2, *a* и *b*) были получены соответствующие точечные диаграммы (scatter plots). В сравнении с профилями экспрессии микроРНК в библиотеке НЕВ, в библиотеке HEN было обнаружено значительное изменение уровня экспрессии 15 известных микроРНК (рис. 3), в частности, было отмечено значительное повышение уровня экспрессии одной микроРНК и снижение уровня экспрессии для 14 других микроРНК. Экспрессии трех микроРНК в библиотеке HEN (miR-148a, miR-29b и miR-136) значительно отличались от таковых в библиотеке НЕВ. Значительное повышение экспрессии было отмечено для miR-148a, сни-

жение экспрессии — для двух других микроРНК. Следует отметить, что результаты количественной ПЦР в реальном времени соответствовали результатам высокопроизводительного секвенирования (рис. 4), что указывает на достоверность результатов последнего.

**Предсказание и анализ фотопериодических сигнальных путей.** Были предсказаны гены-мишени для 15 дифференциально экспрессируемых в библиотеках HEN и HEB микроРНК (4519 генов). Эти гены участвуют в 310 регуляторных путях, включая такие процессы, как фотопериодическая регуляция, мелатонин-опосредованные пути (такие как регуляция циркадного ритма, метаболизм тирозина и щелевые контакты), эстроген-зависимые сигнальные пути (сокращение гладких мышц сосудов, ретроградные эндоканнабиноидные сигнальные пути и ГАМКергический синапс), а также пищевая и эндокринная регуляция (контролируемая эндокринной системой и другими факторами реабсорбция кальция, прогестерон-опосредованное созревание ооцитов, метаболизм тирозина, глицина, серина и треонина). Все вышеупомянутые пути, в том числе пути, ассоциированные с фотопериодическим регулированием, питанием и эстральным циклом, показаны на рис. 5. Примечательно, что описано 5 путей, ассоци-

ированных с фотопериод-зависимой передачей сигнала. Это регулируемая эндокринной системой и другими факторами реабсорбция кальция (99 генов), щелевые контакты (gap junction) (45 генов), холинергический синапс (67 генов), сокращение гладких мышц сосудов (209 генов) и ретроградные эндоканнабиноидные сигнальные пути (62 гена) (рис. 6, *a* и *b*). В настоящей работе на пересечении групп этих генов-мишеней было обнаружено 12 генов (рис. 6, *a*). На основании результатов анализа с использованием GO и KEGG (KEGG enrichment) мы предположили, что ген *GNAQ* является ключевым узлом (hub), ассоциированным с фотопериодом и сезонным эстральным циклом через допаминергический синапс, циркадные ритмы, синтез тиреоидных гормонов, эстроген-зависимый сигнальный путь и GnRH-зависимый (гонадотропин-рилизинг-гормон) сигнальный путь. Соответственно данным о предсказании генов-мишеней, *GNAQ* является геном-мишенью для miR-136. Следует отметить, что также было показано, что некоторые зависимые от питательных веществ сигнальные пути задействованы в регуляции фотопериодических сигнальных путей, таких как метаболизм тирозина (рис. 6, *b*). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что пара miR-136–*GNAQ* играет ключевую роль в

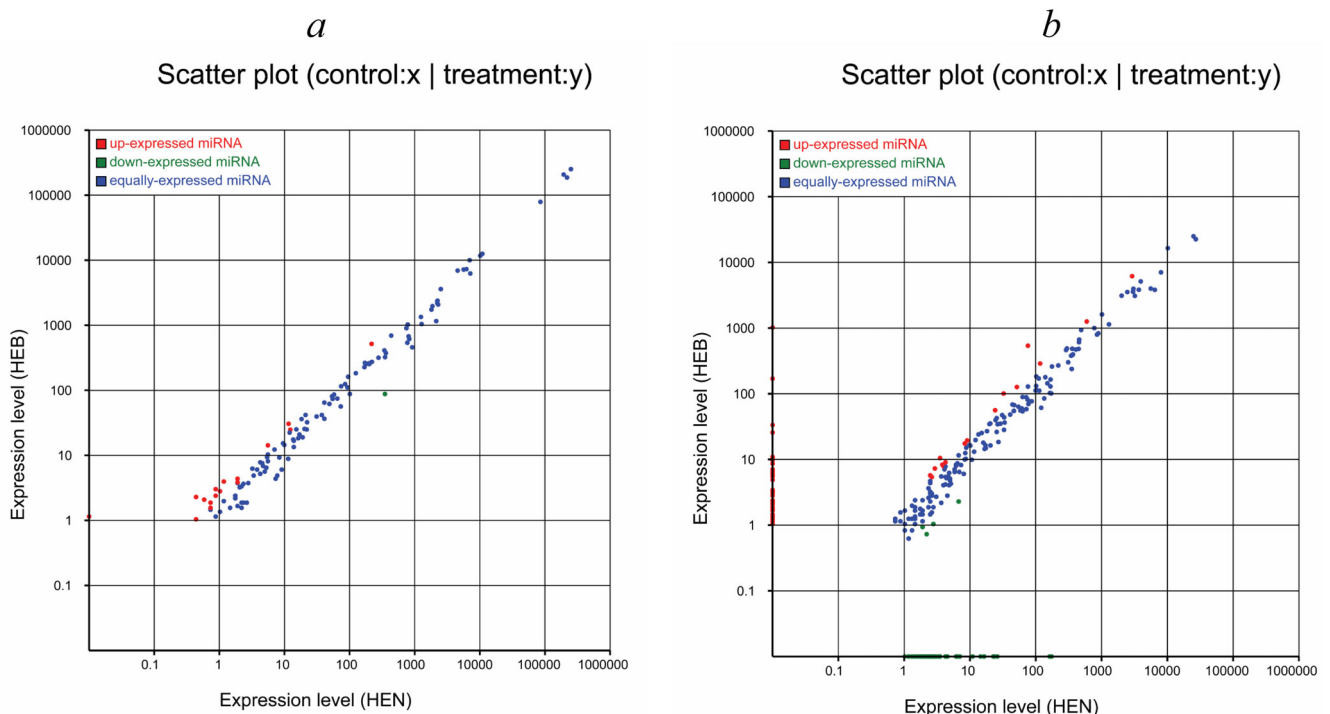


**Рис. 2.** Различные уровни экспрессии микроРНК между группами HEN и HEB. *a* — Известные микроРНК; *b* — новые микроРНК. Ось X — уровни экспрессии микроРНК в группе HEN; ось Y — уровни экспрессии микроРНК в HEB. Одна точка представляет одну микроРНК; точки красного цвета означают кратное изменение  $>2,2$ ; синие точки  $>1/2$ ; зеленые точки обозначают  $<1/2$

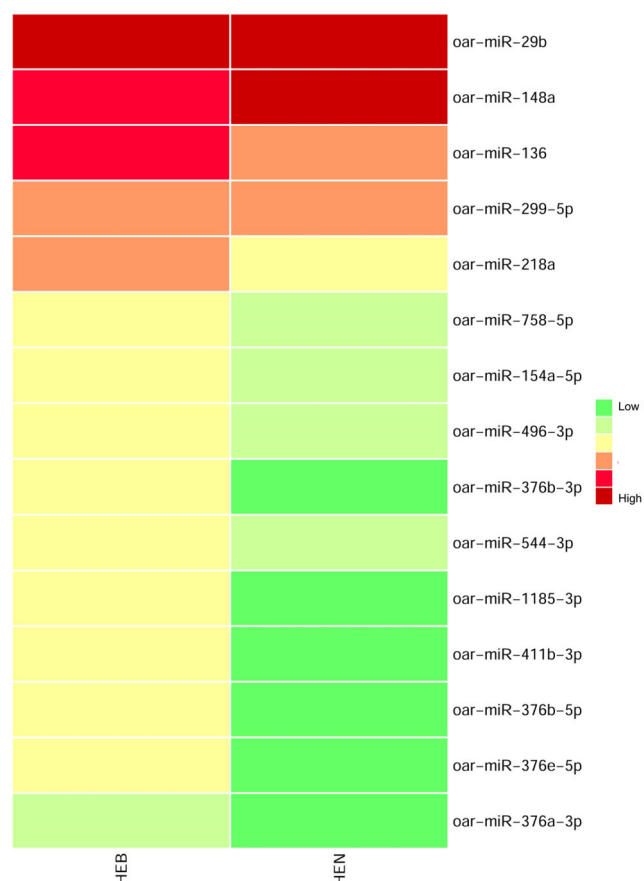


Рис. 3. Известные микроРНК с различной степенью экспрессии в образцах библиотек HEN и HEB

модуляции ингибирующего эффекта LP при улучшении питания.

**Проверка регуляции с отрицательной обратной связью в паре микроРНК–мРНК.** Нами были

изучены профили экспрессии miR-136 и GNAQ в гипоталамусе. Результаты ПЦР в реальном времени свидетельствуют о том, что экспрессия miR-136 в группе HEB в сравнении с HEN значительно снижена ( $p < 0,01$ ). Напротив, экспрессия GNAQ была повышена на 283% ( $p < 0,01$ ) в библиотеке HEN (рис. 7, a), что позволило предположить, что между miR-136 и GNAQ может существовать механизм регулирования с отрицательной обратной связью. Для анализа регуляторных связей между miR-136 и GNAQ рекомбинированные репортерные векторы с 3'-UTR гена GNAQ были котрансфицированы в клетки HeLa с миметиком miR-136. Активность люциферазы Renilla была значительно снижена в группе миметика miR-136 ( $p < 0,01$ ) в сравнении с другими группами, подтверждая, что miR-136 и GNAQ представляют отрицательно регулируемую пару (рис. 7, b и c).

**Функциональная верификация взаимодействий между генами-мишенями микроРНК и генами, ассоциированными с фотопериодическим эстральным циклом в целевых клетках.** Мы стремились проанализировать показатели экспрессии GNAQ при различных схемах существования животных, включая эстральное и анэстральное состояние в условиях LP, а также эстральное состояние в условиях SP. Профили тканевой экспрессии показаны на рис. 8, a. Уровни экспрессии GNAQ были выше в ткани гипоталамуса при анэстральном состоянии (HNN), сниженные уровни экспрессии были зафиксированы в эстральном состоянии в условиях LP (HEN) и SP (HEB). Следовательно, уровни экспрессии GNAQ могут влиять на эструс при разных схемах воздействия на животных. Для дальнейшего подтверждения ингибирующего

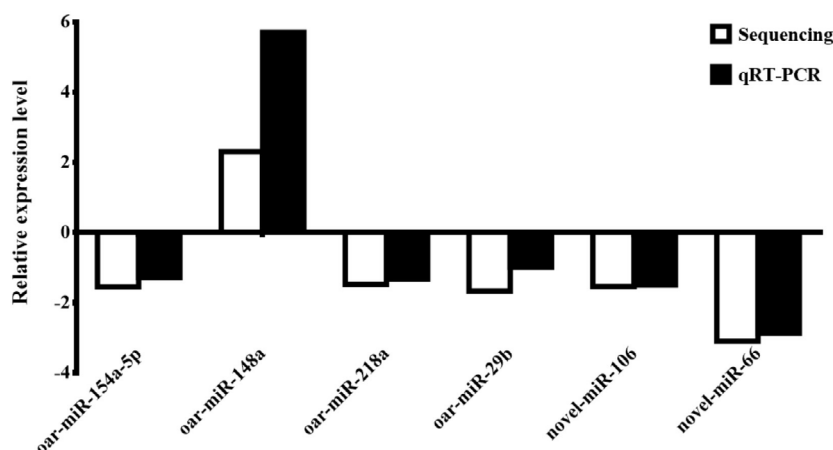


Рис. 4. Валидация результатов секвенирования по технологии Solexa образцов микроРНК из ткани гипоталамуса с использованием ПЦР в реальном времени. Предсказанные новые микроРНК были названы случайным образом с префиксом «novel». Изменения уровня экспрессии представляют изменения в библиотеке HEB в сравнении с HEN

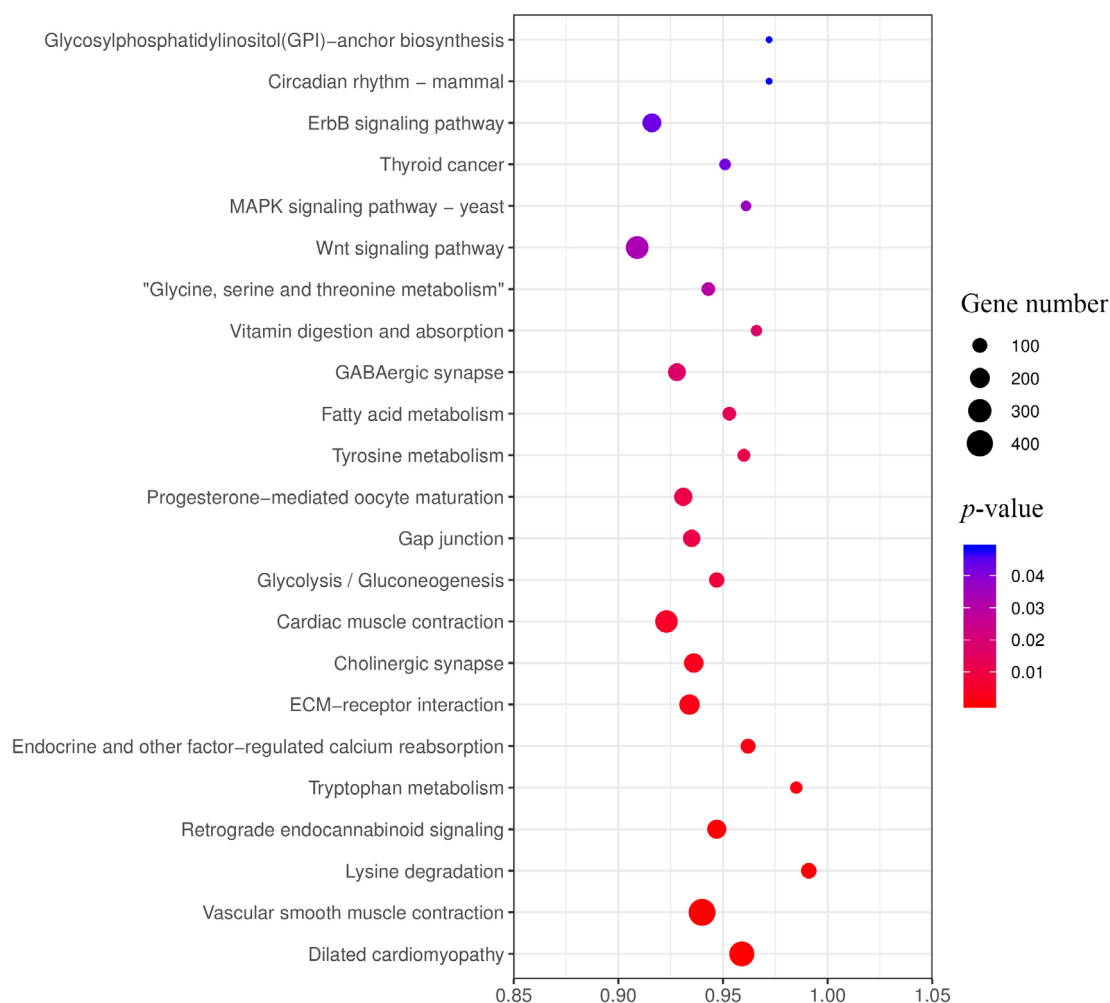


**Рис. 5.** Кластеризованная тепловая карта базы данных KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Показаны пути, обнаруживаемые в различных фотопериодических условиях при дополнительном питании. Интенсивность окраски характеризует оценку представленности для каждого пути KEGG

эффекта miR-136 в отношении *GNAQ* и изучения потенциальных регуляторных взаимодействий между фотопериодом и сезонным эстральным циклом были отобраны некоторые ключевые гены из классического сезонного репродуктивного пути и проанализирована их экспрессия в культуре клеток гипоталамуса. Экспрессия *GNAQ* была понижена в группе, трансфицированной миметиком miR-136 по сравнению с экспрессией этого гена в группе отрицательного контроля (miR-136-NC). Кроме того, было отмечено изменение уровня экспрессии генов, ассоциированных с эстральным циклом. Так, была повышена экспрессия генов *KISS1* и *GnRH* ( $p < 0,05$ ), а экспрессия генов *DIO2* и *TSHB* была заметно понижена ( $p < 0,05$ ) (рис. 8, *b*). Эти результаты свидетельствуют о том, что пара miR-136–*GNAQ* может играть важную роль в изменении эффекта фотопериода

дического ингибирования у племенных животных с сезонным циклом воспроизводства.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В природных условиях фотопериод является важным фактором, который модулирует репродуктивную способность, в частности у мелких жвачных животных, и оказывает влияние на эстральный цикл и эффективность размножения. Тем не менее фотопериод также стал одним из основных лимитирующих факторов, предотвращающим круглогодичное размножение большинства млекопитающих. Овцы казахской породы хорошо известны в северном Китае как типичная порода с сезонным циклом воспроизводства. В предыдущей работе мы обнаружили, что улучшение питания может влиять на инги-

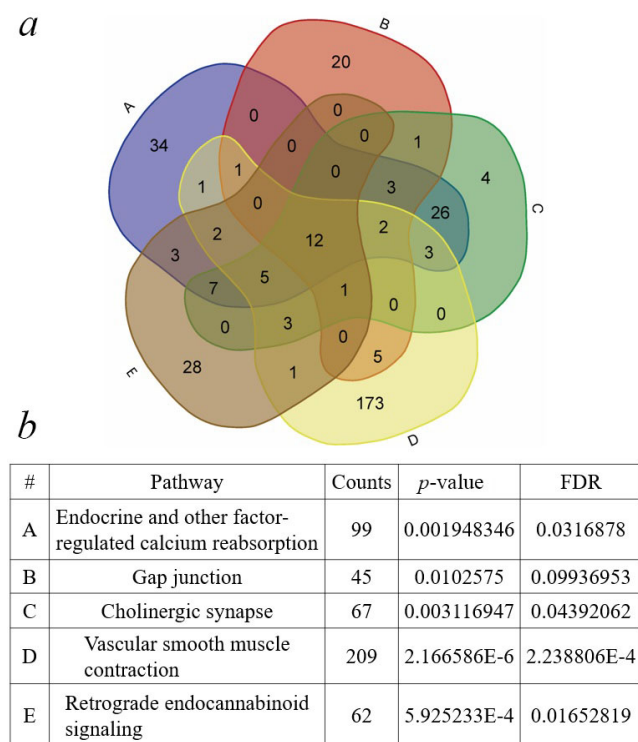


**Рис. 6.** Пять сигнальных путей, тесным образом ассоциированные с фотопериодом, питанием и эстральным циклом при дополнительном питании. Были посчитаны перекрывающиеся гены-мишени, относящиеся к этим сигнальным путям (a), и показано количество генов-мишеней в каждом пути (b)

бирующий эффект LP на эстральное поведение овец, приводя к удлинению продолжительности сезона размножения и соответствующему укорочению периода анэструса. Таким образом, улучшение питания подталкивает овец к инициации нового эстрального цикла вне сезона размножения [16, 22]. Примечательно, что мы не обнаружили никаких различий в поведении при естественном и индуцированном эструсе при различных фотопериодических условиях; в то же время наличие различий в молекулярном механизме регуляции инициации эструса оставалось под вопросом. Следовательно, для анализа механизма, лежащего в основе инициации эструса у этих овец, были необходимы дополнительные исследования. Настоящая работа способствует пониманию деталей молекулярного механизма инициации и окончания эструса у племенных животных.

В настоящей работе, основанной на моделировании условий сезонного фотопериода, нами были созданы две библиотеки микроРНК из гипоталамуса животных, помещенных в условия LP и SP при повышенном уровне питания (библиотеки HEN и HEV соответственно). С помощью анализа паттернов экспрессии мик-

роРНК мы идентифицировали 15 дифференциально экспрессируемых в библиотеках HEN и HEV известных микроРНК. Из них следует отметить три наиболее важные высоко экспрессируемые микроРНК, а именно miR-148a, miR-29b и miR-136. Ранее в ряде работ было показано, что miR-136 может ингибировать экспрессию рецептора лютеинизирующего гормона (LHR – luteinizing hormone receptor) в яичниках [23, 24]. LHR способен модулировать экспрессию генов биологических часов, ассоциированных с сезонным эстральным циклом [25–27], что позволяет предположить, что miR-136 играет важную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-овариальной оси (HPO axis). Анализ с использованием баз данных GO и KEGG показал существование важного хаба, гена *GNAQ*, опосредующего взаимосвязь между фотопериодом и ассоциированными с эструсом сигнальными путями, задействованными во многих биологических системах, таких как циркадные ритмы, допаминергический синапс, синтез тиреоидных гормонов, GnRH-опосредованный сигнальный путь, эстроген-опосредованный сигнальный путь, а также регулируемый эндокринной системой и другими факторами процесс реабсорбции кальция и сокращение гладких мышц сосудов (рис. 5). В настоящей работе с использованием программ TargetScan и RNAhybrid мы показали, что miR-136, предположительно, имеет возможность целенаправленно воздействовать на *GNAQ*. Кроме того, основываясь на полученных результатах, мы выбрали пару miR-136–*GNAQ* для проведения целевой проверки их связи путем трансфекции клеток HeLa миметиком miR-136 и отрицательным контролем. Полученные результаты подтвердили существование отрицательной обратной связи между miR-136 и *GNAQ*, что соответствовало профилям их тканевой экспрессии в тех же образцах. Поэтому мы пришли к выводу, что таргетирование *GNAQ* с помощью miR-136 может быть связано с фотопериодическим ингибированием, играя роль триггера для прекращения сезонного эстрального цикла в условиях LP.

В настоящее время описано два основных сигнальных пути, которые, предположительно, связаны с фотопериодизмом и эструс-ассоциированными сигнальными путями, а именно KISS1/GPR54 и TSH-DIO2/DIO3 [22, 28–32]. Для дальнейшего исследования биологической функции miR-136 в таргетировании *GNAQ* в регуляторных путях, ассоциированных с фотопериодом и сезонным эстральным циклом, нами были отобраны ключевые гены (*KISS1*, *GPR54*, *DIO2*, *DIO3*, *TSHB* и *GnRH*) для проведения ана-

лиза их функций в клетках гипоталамуса овцы. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что экспрессия *KISS1* и *GnRH* значительно повышается в клетках гипоталамуса овец при *miR-136*-инициированном снижении экспрессии *GNAQ*. Напротив, экспрессия *TSHB* и *DIO2* была существенно понижена, что позволяет предположить, что путь *KISS1/GPR54* активируется тогда, когда имеет место снижение экспрессии *GNAQ*, в то время как инициация пути *TSH-DIO2/DIO3* происходит при повышении экспрессии *GNAQ* в гипоталамусе. Более

того, в ряде работ показано, что путь *KISS1/GPR54* может участвовать в активации оси *HPO* в условиях *SP* или сезона размножения [33, 34]. Сходные результаты также получены при определении профиля экспрессии *GNAQ* в ткани гипоталамуса. Такой результат может объясняться большим содержанием *ERα* в нейронах *KISS1*, но не в нейронах *GnRH* [35–38], что приводит к появлению отрицательной обратной связи с эстрогеном. Описанные выше эффекты играют важную роль в опосредовании выброса *GnRH* и инициации нормального цикла раз-

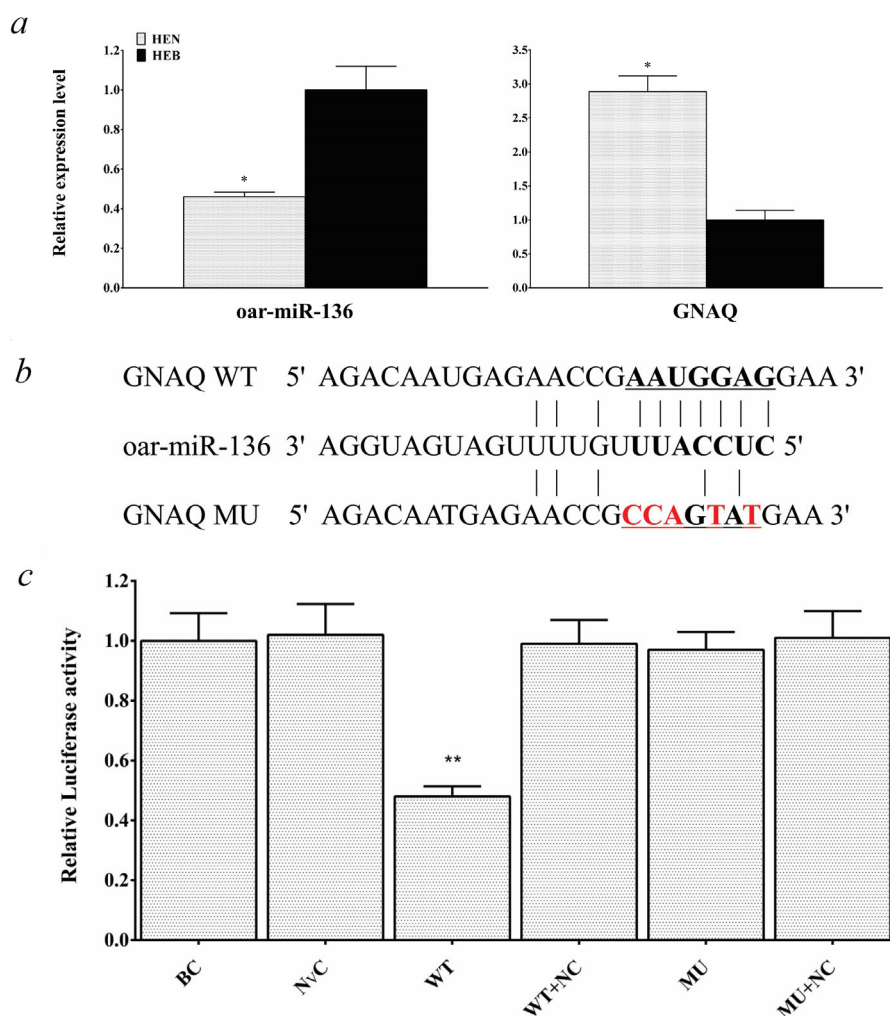


**Рис. 7.** *a* – Относительные уровни экспрессии *oar-miR-136* и её мишени *GNAQ* в гипоталамусе (сравнение HEN и HEB). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). \*  $p < 0,05$ , статистически достоверные различия. *b* – Схематическое изображение целевой последовательности *oar-miR-136* в 5'-UTR гена *GNAQ*. Пять нуклеотидов (комплементарных нуклеотидам 1, 3, 5, 6 и 7 *oar-miR-136*) были модифицированы в 3'-UTR гена *GNAQ*. *c* – Активность гена люциферазы, связанного с 3'-UTR гена *GNAQ*. Плазмиды *psiCHECKTM-2* с репортерной люциферазой светлячка и с 3'-UTR дикого типа (WT) или мутированными 3'-UTR (MU) гена *GNAQ* были трансфицированы в клетки Hela вместе с пустым вектором, миметиком *oar-miR-136* или миметиком отрицательного контроля и геном-репортером люциферазы Renilla (для нормализации данных). Активность люциферазы измеряли через 48 ч. За 100% брали средние значения результатов по клеткам, трансфицированным контрольным вектором *psiCHECKTM-2*. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD) ( $n = 3$ ). \*\*  $p < 0,01$ , статистически достоверные различия

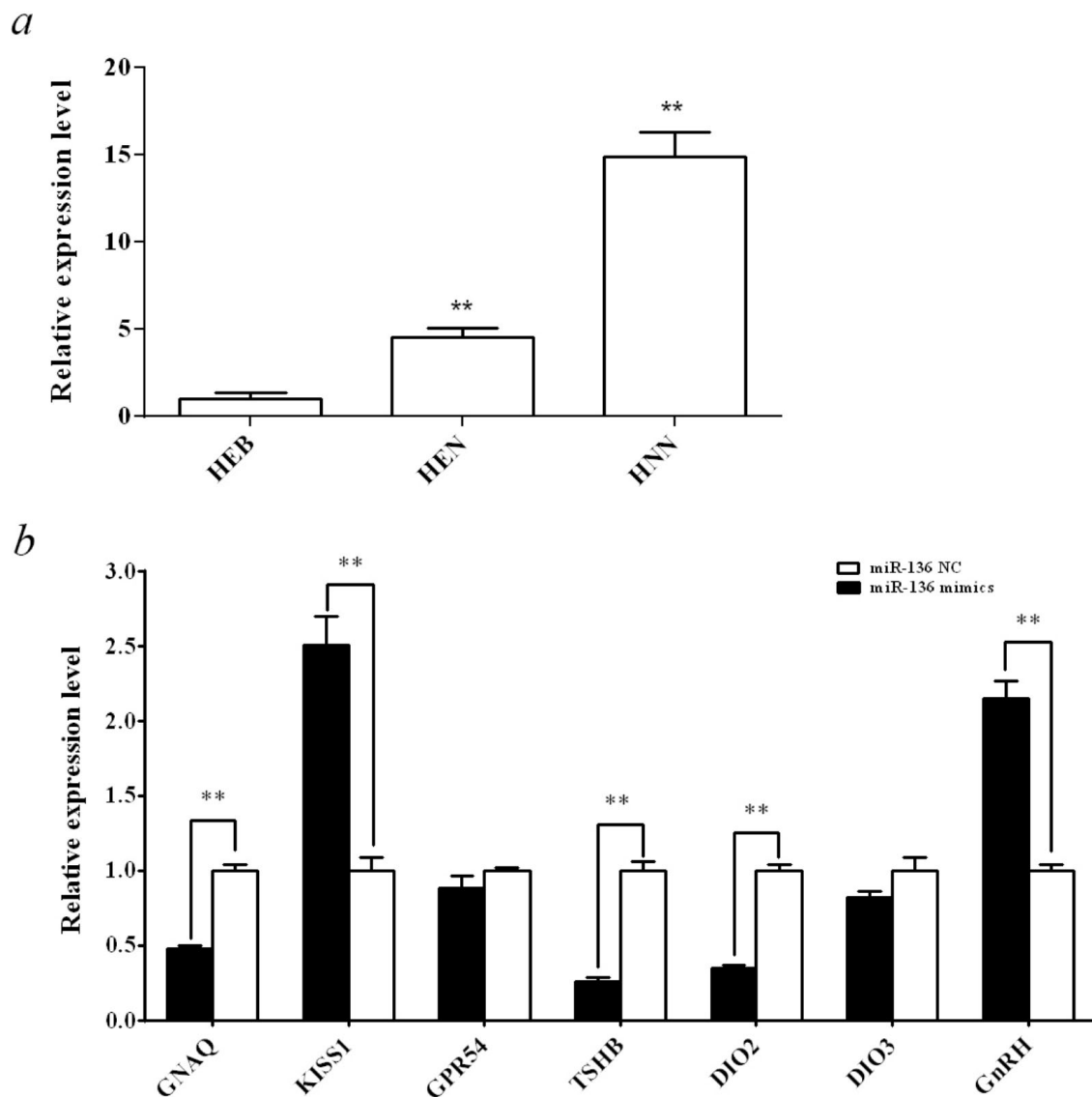


**Рис. 8.** *a* – Уровни экспрессии *GNAQ* у отдельных особей при различных схемах. *b* – Относительная экспрессия *GNAQ* и родственного ему гена в нервных клетках гипоталамуса овец от трансфицированных различным образом групп. Все эксперименты проводились независимо и как минимум три раза. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ , статистически достоверные различия

множения, чей эффект, вероятно, передается в мозг через нейроны *KISS1*, а не через нейроны *GnRH* в гипоталамусе [39–41]. Напротив, в ряде других работ показано, что путь *TSH-DIO2/DIO3* скорее блокирует активность оси *HPO*, что обычно происходит в условиях *LP* или вне сезона размножения [42, 43]. Эти результаты соответствуют профилю тканевой экспрессии, определенному в настоящей работе. Такая картина может быть обусловлена повышенной экспрессией *DIO2*, который в гипоталамусе может превращать *T4* в *T3* для прекращения репродуктивной активности [4, 44, 45]. Следовательно, наши результаты свидетельствуют о том,

что в условиях обычного или недостаточного питания и длинного светового дня происходит усиление действия *miR-136* на *GNAQ*. С учетом того, что *GNAQ* преимущественно действует на путь *TSH-DIO2/DIO3*, можно предположить, что в таком случае путь *TSH-DIO2/DIO3* не может инициировать нормальный эстральный цикл и в конечном итоге особь остается в анэстральном состоянии в условиях *LP*. Напротив, при улучшенном питании в условиях *LP* экспрессия *GNAQ* понижается, что приводит к его сопряжению с путем *KISS1/GPR54* и активации эстрального цикла в условиях фотопериодического ингибирования.

В целом, с использованием биоинформатических методов анализа нами были идентифицировано 15 дифференциально экспрессируемых известных микроРНК в библиотеках НЕН и НЕВ. Кроме того, мы установили, что пара miR-136–GNAQ может потенциально являться ключевым игроком в молекулярном механизме, с помощью которого модулируются начало эструса и её окончание у племенных животных с сезонным циклом. Эти результаты важны для лучшего понимания взаимосвязей между сезонно размножающимися сельскохозяйственными животными и их окружением. Они могут быть использованы в качестве комплексной технической поддержки для достижения круглогодичного воспроизводства у светочувствительных сезонно размножающихся млекопитающих.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность коллегам из лаборатории за предоставление экспертных мнений и рекомендаций, необ-

ходимых для проведения данного исследования.

**Финансирование.** Настоящая работа получила финансирование от Национального фонда естественных наук КНР (31802065), исследовательского проекта Фонда финансирования докторских стартапов проекта CQ Юго-западного Университета (SWU119013), поддерживаемого Фондом естественных наук (csc2020jcyj-msxmX0427).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

**Соблюдение этических норм.** Были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные положения по уходу и использованию 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](http://www.springer.com/journal/10541)), том 86, вып. 10, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldman, B. D. (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement, *J. Biol. Rhythm.*, **16**, 283-301.
- Forcada, F., and Abecia, J. A. (2006) The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes, *Reprod. Nutr. Dev.*, **46**, 355-365.
- Greives, T. J., Mason, A. O., Scotti, M. A. L., Levine, J., Ketterson, E. D., et al. (2007) Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction, *Endocrinology*, **148**, 1158-1166.
- Shinomiya, A., Shimmura, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., and Yoshimura, T. (2014) Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone, *Front. Endocrinol.*, **5**, 12.
- Wodzicka-Tomaszewska, M., Hutchinson, J. C. D., and Bennett, J. W. (1967) Control of the annual rhythm of breeding in ewes: effect of an equatorial daylength with reversed thermal seasons, *J. Agr. Sci.*, **68**, 61-67.
- Marshall, F. H. A. (1937) On change over in oestrous cycle in animals after transference across equator, with further observations on incidence of breeding season and factors controlling sexual periodicity, *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B*, **122**, 413-428.
- Legan, S. J., and Karsch, F. J. (1983) Importance of retinal photoreceptors to the photoperiodic control of seasonal breeding in the ewe, *Biol. Reprod.*, **29**, 316-325.
- Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J. P., Thimonier, J., and Volland-Nail, P. (1988) Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod, *Aust. J. Biol. Sci.*, **41**, 69-86.
- Lincoln, G. A., and Clarke, I. J. (1994) Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams; evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland, *J. Neuroendocrinol.*, **6**, 251-260.
- Abecia, J. A., Chemineau, P., Flores, J. A., Keller, M., Duarte, G., et al. (2015) Continuous exposure to sexually active rams extends estrous activity in ewes in spring, *Theriogenology*, **84**, 1549-1555.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., and Delgadillo, J. A. (1992) Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod, *Small Ruminant Res.*, **8**, 299-312.
- Estrada-Cortés, E., Vera-Avila, H. R., Urrutia-Morales, J., Villagómez-Amezcu, E., Jiménez-Severiano, H., et al. (2009) Nutritional status influences reproductive seasonality in Creole goats: 1. Ovarian activity during seasonal reproductive transitions, *Anim. Reprod. Sci.*, **116**, 282-290.
- Zarazaga, L. A., Guzmán, J. L., Domínguez, C., Pérez, M. C., and Prieto, R. (2005) Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats, *Anim. Reprod. Sci.*, **87**, 253-267.
- Lazarin, G. B., Alves, N. G., Perez, J. R. O., Lima, R. R. D., Garcia, I. F. F., et al. (2012) Plasma urea nitrogen and progesterone concentrations and follicular dynamics in ewes fed proteins of different degradability, *Rev. Bras. Zootecn.*, **41**, 1638-1647.
- Zarazaga, L. A., Gatica, M. C., Celi, I., Guzmán, J. L., and Malpau, B. (2011) Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity during the non-breeding season in Mediterranean goat females, *Anim. Reprod. Sci.*, **125**, 81-87.
- Yang, H., Liu, X. X., Hu, G. D., Xie, Y. F., Lin, S., et al. (2018) Identification and analysis of microRNAs-mRNAs

- pairs associated with nutritional status in seasonal sheep, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **499**, 321-327.
17. Rosalind, C. L., Rhonda, L. F., and Ambrost, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, **75**, 843-854.
  18. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., and Pasquinelli, A. E. (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **403**, 901-906.
  19. Meister, B., Herzer, S., and Silahatoglu, A. (2013) MicroRNAs in the hypothalamus, *Neuroendocrinology*, **98**, 243-253.
  20. Cui, W., Zhang, Y., Hu, N., Shan, C., Zhang, S., et al. (2010) miRNA-520b and miRNA-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3' UTR of CD46, *Cancer Biol. Ther.*, **10**, 232-241.
  21. Yang, H., Lin, S., Lei, X., Yuan, C., Yu, Y., et al. (2018) Nutritional status affects the microRNA profile of the hypothalamus of female sheep, *Reprod. Fert. Dev.*, **30**, 946-957.
  22. Yang, H., Lin, S., Lei, X. P., Yuan, C., Tian, Z. W., et al. (2016) Identification and profiling of microRNAs from ovary of estrous Kazakh sheep induced by nutritional status in the anestrus season, *Anim. Reprod. Sci.*, **175**, 18-26.
  23. Kishi, H., Kitahara, Y., Imai, F., Nakao, K., and Suwa, H. (2018) Expression of the gonadotropin receptors during follicular development, *Reprod. Med. Biol.*, **17**, 11-19.
  24. Kitahara, Y., Nakamura, K., Kogure, K., and Minegishi, T. (2013) Role of microRNA-136-3p on the expression of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovaries, *Biol. Reprod.*, **89**, 114.
  25. Shimizu, T., Watanabe, K., Anayama, N., and Miyazaki, K. (2017) Effect of lipopolysaccharide on circadian clock genes *Per2* and *Bmal1* in mouse ovary, *J. Physiol. Sci.*, **67**, 623-628.
  26. Shimizu, T., Hirai, Y., Murayama, C., Miyamoto, A., Miyazaki, H., and Miyazaki, K. (2011) Circadian Clock genes *Per2* and clock regulate steroid production, cell proliferation, and luteinizing hormone receptor transcription in ovarian granulosa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 132-135.
  27. Li, L., Zhang, Z., Peng, J., Wang, Y., and Zhu, Q. (2014) Cooperation of luteinizing hormone signaling pathways in preovulatory avian follicles regulates circadian clock expression in granulosa cell, *Mol. Cell. Biochem.*, **394**, 31-41.
  28. Guh, Y. J., Tamai, T. K., and Yoshimura, T. (2019) The underlying mechanisms of vertebrate seasonal reproduction, *P. Jap. Acad. Ser. B*, **95**, 343-357.
  29. Huang, D. W., Wang, J. X., Liu, Q. Y., Chu, M. X., Di, R., et al. (2013) Analysis on DNA sequence of TSHB gene and its association with reproductive seasonality in goats, *Mol. Biol. Rep.*, **40**, 1893-1904.
  30. Pineda, R., Aguilar, E., Pinilla, L., and Tena, S. M. (2010) Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction, *Prog. Brain Res.*, **18**, 55-77.
  31. Kauffman, A. S., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (2007) Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction, *Trends Neurosci.*, **30**, 504-511.
  32. Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena, S. M. (2008) New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function, *Front. Neuroendocrinol.*, **29**, 48-69.
  33. Clarkson, J., de Tassigny, X. D. A., Moreno, A. S., Colledge, W. H., and Herbison, A. E. (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge, *J. Neurosci.*, **28**, 8691-8697.
  34. Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H., and Catt, K. J. (2009) The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms, *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**, 402-408.
  35. Smith, J. T., Clay, C. M., Caraty, A., and Clarke, I. J. (2007) KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season, *Endocrinology*, **48**, 1150-1157.
  36. Dubois, S. L., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., and Levine, J. E. (2016) Estradiol restrains prepubertal gonadotropin secretion in female mice via activation of ER $\alpha$  in kisspeptin neurons, *Endocrinology*, **157**, 1546-1554.
  37. Mayer, C., Acosta-Martinez, M., Dubois, S. L., Wolfe, A., Radovick, S., et al. (2010) Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor  $\alpha$ -signaling in kisspeptin neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22693-22698.
  38. Wintermantel, T. M., Campbell, R. E., Porteous, R., Bock, D., Gröne, H. J., et al. (2006) Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility, *Neuron*, **52**, 271-280.
  39. Smith, J. T., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (2006) Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling, *Reproduction*, **131**, 623-630.
  40. Piet, R., Boehm, U., and Herbison, A. E. (2013) Estrous cycle plasticity in the hyperpolarization-activated current  $I_h$  is mediated by circulating 17 $\beta$ -estradiol in preoptic area kisspeptin neurons, *J. Neurosci.*, **33**, 10828-10839.
  41. Mittelman-Smith, M. A., Wong, A. M., Kathiresan, A. S., and Micevych, P. E. (2015) Classical and membrane-initiated estrogen signaling in an *in vitro* model of anterior hypothalamic kisspeptin neurons, *Endocrinology*, **156**, 2162-2173.
  42. Bechtold, D. A., and Loudon, A. S. (2007) Hypothalamic thyroid hormones: mediators of seasonal physiology, *Endocrinology*, **148**, 3605-3607.
  43. Fraire-Cordero, S., Salazar-Ortiz, J., Cortez-Romero, C., Pérez-Hernández, P., Herrera-Corredor, C. A., and Gallegos-Sánchez, J. (2018) External stimuli help restore post-partum ovarian activity in Pelibuey sheep, *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **48**, 2.
  44. Beltramo, M., Dardente, H., Cayla, X., and Caraty, A. (2014) Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin, *Mol. Cell Endocrinol.*, **382**, 387-399.
  45. Dardente, H., Wood, S., Ebling, F., and Sáenz de Miera, C. (2019) An integrative view of mammalian seasonal neuroendocrinology, *J. Neuroendocrinol.*, **31**, e12729.

## COMPARATIVE ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED microRNAs IN THE HYPOTHALAMUS OF KAZAKH SHEEP EXPOSED TO DIFFERENT PHOTOPERIOD CONDITIONS

H. Yang<sup>1,2\*\*</sup>, L. Fu<sup>3#</sup>, Q. Luo<sup>1#</sup>, L. Li<sup>1</sup>, F. Zheng<sup>1</sup>, X. Liu<sup>4</sup>, Z. Zhao<sup>4</sup>, Z. Wang<sup>1</sup>, and H. Xu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Southwest University, 404100 Chongqing, China;  
e-mail: yh20183007@swu.edu.cn, 280111842@qq.com

<sup>2</sup> Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, 404100 Chongqing, China

<sup>3</sup> Research Institute of Herbivorous Livestock, Chongqing Academy of Animal Sciences, 404100 Chongqing, China

<sup>4</sup> College of Animal Science and Technology, Shihezi University, 830000 Xinjiang, China

MicroRNAs (miRNA) plays an important role in several mammalian biological regulatory processes by post-transcriptionally regulating gene expression. However, there is little information on the miRNAs involved in the photoperiodism pathway that controls seasonal activity. To enhance our knowledge on the effect of different photoperiod conditions on miRNA, we divided Kazakh sheep into two groups: one exposed to a long photoperiod (LP, 16L:8D) and another – to a short photoperiod (SP, 8L:16D) under supplemental feeding conditions. Further we compared the related miRNAs and target genes between the two groups. Fifteen differentially expressed miRNAs were identified, which were associated with 310 regulatory pathways covering photoperiodism, reproductive hormones, and nutrition. The miR-136-GNAQ pair was selected and validated as a differentially expressed, and a dual-luciferase reporter assay showed that the negative feedback loop existed between them. Examination of the expression profile revealed that the GNAQ expression was low in the estrous females both under LP and SP conditions, but high expression of GNAQ was observed in the anestrous females under LP conditions. Moreover, functional analysis revealed that KISS1 and GnRH expression was upregulated when GNAQ expression was downregulated in the hypothalamic cells, whereas DIO2 and TSHB expression was downregulated. Thus, miR-136-GNAQ might act as a switch in the regulation of seasonal estrus under different photoperiod conditions. These findings further enrich our understanding of the relationship between miRNAs and seasonal regulation of reproductive activity. Furthermore, our study provides novel insights into the miRNA-mediated regulatory mechanisms for overcoming photoinhibition in the seasonally breeding mammals, such as Kazakh sheep.

**Keywords:** miRNA, hypothalamus, target gene, nerve-endocrine regulation, feedback loop

УДК 577.29

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ СИСТЕМ CRISPR-Cas ТИПА III

### Обзор

© 2021 М.В. Колесник<sup>1\*</sup>, Я.В. Федорова<sup>2,3</sup>, К.О. Корнеева<sup>1</sup>,  
Д.Н. Артамонова<sup>1</sup>, К.В. Северинов<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий, Центр наук о жизни, 121205 Москва, Россия;  
электронная почта: matveykolesnik@gmail.com; severik@waksman.rutgers.edu

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт биологии гена РАН, Центр высокоточного редактирования  
и генетических технологий для биомедицины, 119334 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт микробиологии Ваксмана, 08854 Нью-Джерси, США

Поступила в редакцию 01.06.2021

После доработки 24.08.2021

Принята к публикации 30.08.2021

Возникновение паразитических генетических элементов свойственно всем живым системам. В ходе эволюции у клеточных организмов появилось множество систем защиты, которые препятствуют распространению паразитических элементов. Широко распространённые у прокариот системы CRISPR-Cas позволяют специфически распознавать и уничтожать чужеродные нуклеиновые кислоты. Механизм работы систем CRISPR-Cas основывается на приобретении и хранении фрагментов чужеродных нуклеиновых кислот и их использовании для разрушения чужеродного комплементарного генетического материала эффекторными рибонуклеиновыми комплексами. Системы CRISPR-Cas активно изучаются, поскольку некоторые из них используются для геномного редактирования. Системы CRISPR-Cas типа III широко распространены, но мало изучены из-за повышенной в сравнении с системами других типов сложности механизма их работы. Эффекторные комплексы систем типа III специфически распознают и расщепляют молекулы РНК. Распознавание РНК-мишени активирует субъединицу эффектора – так называемую «CRISPR-полимеразу», которая расщепляет ДНК и производит небольшие циклические олигонуклеотиды. Последние активируют ряд вспомогательных эффекторов, в частности, неспецифические рибонуклеазы. В этом обзоре рассмотрена история исследований систем CRISPR-Cas типа III, а также суммированы текущие данные о структуре и активности компонентов этих систем, их биологической роли и эволюционной истории. С помощью структурного моделирования с использованием программы AlphaFold2 показано, что консервативный ранее не охарактеризованный белок HRAMP систем архей является вырожденным гомологом белка Cas10 CRISPR-Cas типа III, что позволяет предположить, что системы HRAMP и системы CRISPR-Cas типа III имеют общую эволюционную историю.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** системы CRISPR-Cas типа III, защитные системы прокариот, сигнальные олигонуклеотиды, эволюция систем CRISPR-Cas, системы HRAMP.

DOI: 10.31857/S0320972521100134

### ВВЕДЕНИЕ

Все известные формы жизни на Земле обладают универсальным свойством: практически все их биологические признаки определены

последовательностями нуклеиновых кислот, воспроизводимыми по матричному принципу. Хотя изменения в последовательностях нуклеиновых кислот могут оказывать очень сильное влияние на биологические признаки (например, на структуры белков, которые они кодируют), сами эти изменения, как правило, не оказывают влияния на химические и физические свойства нуклеиновых кислот, что делает возможным существование молекул нуклеиновых кислот с практически любыми возможными последовательностями. Поскольку повышение точности репликации может быть достигнуто

Принятые сокращения: ОАС – олигоаденилатсинтетаза; цГАС – синтаза циклического ГМФ-АМФ; цОА – циклические олигоаденилаты; CARF – CRISPR-Cas Associated Rossmann Fold; crPNC – CRISPR-PNC; HEPN – Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding; PAM – Protospacer Adjacent Motifs; RAMP – Repair Associated Mysterious Proteins; RT – обратная транскриптаза.

\* Адресат для корреспонденции.

только за счёт повышения затрат энергии [1], процесс репликации всегда подвержен ошибкам, из-за которых возникает изменчивость биологических признаков, кодируемых нуклеиновыми кислотами. Эта изменчивость является объектом действия естественного отбора и/или генетического дрейфа и, таким образом, обеспечивает эволюционный процесс.

В любом сообществе эволюционирующих самовоспроизводящихся систем неизбежно появляются, с одной стороны, генетические паразиты, а с другой — защитные системы для борьбы с ними [2]. Поэтому «гонка вооружений» между эгоистичными генетическими элементами и их хозяевами, по-видимому, началась с момента возникновения жизни. В ходе этой гонки у хозяев развиваются системы защиты, которые нацелены на различные механизмы, существенные для жизненного цикла паразита. В свою очередь, паразиты вырабатывают механизмы, позволяющие им избежать действия защитных систем хозяина. Полностью избавиться от генетических паразитов, по всей видимости, невозможно, поскольку это снижает интенсивность горизонтального переноса генов, необходимого для поддержания стабильности генома и эволюционного процесса [2]. Эволюция защитных систем подчас идёт очень причудливыми путями и включает «перетасовку» компонентов разных защитных систем, а также захват генов самих генетических паразитов. С этой точки зрения системы CRISPR-Cas особенно интересны, поскольку они представляют собой сложную химеру, состоящую из «прирученных» транспозонов, токсин-антитоксигенов систем и других компонентов неясного происхождения. В этом обзоре мы рассмотрим структурные и механистические особенности систем CRISPR-Cas типа III, которые являются самыми сложными из известных на текущий момент защитных систем прокариот.

Разнообразие систем CRISPR-Cas и механизмов опосредованного ими иммунитета были подробно описаны во множестве обзоров (см., например, [3, 4]). Большинство локусов CRISPR-Cas содержат кассеты CRISPR, которые состоят из идентичных повторов, разделённых уникальными спейсерами, а также ассоциированные с кассетами CRISPR кластеры белок-кодирующих генов *cas*. Механизм CRISPR-Cas-опосредованного иммунитета можно разделить на три стадии: а) адаптация, б) экспрессия и в) интерференция (на рис. 1 приведена схема этих стадий для систем CRISPR-Cas типа III). На стадии адаптации короткие фрагменты ДНК встраиваются в CRISPR-кассету с формированием нового спейсера. Встраивание новых

спейсеров производится комплексом белков Cas1–Cas2. Этот комплекс наиболее консервативен и присутствует во всех полных системах CRISPR-Cas, однако детали механизма адаптации зависят от типа системы. На стадии экспрессии CRISPR-кассеты транскрибируются с образованием молекул пре-CRISPR-РНК, которые процессируются с образованием зрелых CRISPR-РНК (сгРНК). Этап созревания сгРНК опосредуется различными механизмами, которые зависят от типа системы CRISPR-Cas. На стадии интерференции сгРНК взаимодействуют с Cas-белками, формируя эффекторные комплексы, которые распознают и расщепляют нуклеиновые кислоты, комплементарные сгРНК. Системы CRISPR-Cas закодированы в ~90% последовательностей геномов архей и ~40% геномов эубактерий [5]. По составу эффекторных комплексов системы CRISPR-Cas можно разделить на два класса. Эффекторы систем класса 1 представляют собой комплексы, состоящие из многих белков; эффекторы класса 2 состоят из одного большого многодоменного белка в комплексе с сгРНК. На основе анализа состава и организации *cas*-локусов системы CRISPR-Cas были подразделены на 6 типов и несколько подтипов; типы I, III и IV относятся к классу 1, а типы II, V и VI относятся к классу 2 [4]. В этом обзоре будут подробно рассмотрены только системы типа III.

### ОБЗОР ИСТОРИИ ИССЛЕДОВАНИЙ СИСТЕМ CRISPR-CAS ТИПА III

Системы CRISPR-Cas типа III широко распространены в геномах бактерий и архей, составляя 34% и 25% полных локусов CRISPR-*cas*, обнаруженных в геномах [5]. Впервые последовательности *cas*-генов, относящихся к системам типа III, были обнаружены в процессе поиска консервативных кластеров генов в отсеквенированных на тот момент геномах гипертермофильных архей. В то время было выдвинуто предположение, что эти гены принадлежат к ранее неизвестной системе репарации ДНК [6]. Среди генов, содержащихся в обнаруженных кластерах, Макарова et al. [6] обнаружили группу генов, кодирующих большие консервативные белки, содержащие Palm-домены. Домены Palm входят в состав некоторых ферментов, осуществляющих матричный синтез полинуклеотидов, а также в состав различных циклаз и нуклеотидилтрансфераз [7, 8]. Поэтому было сделано предположение, что эти, содержащие Palm-домены, белки также являются полимеразми или циклазами. Также было обнаружено несколько се-

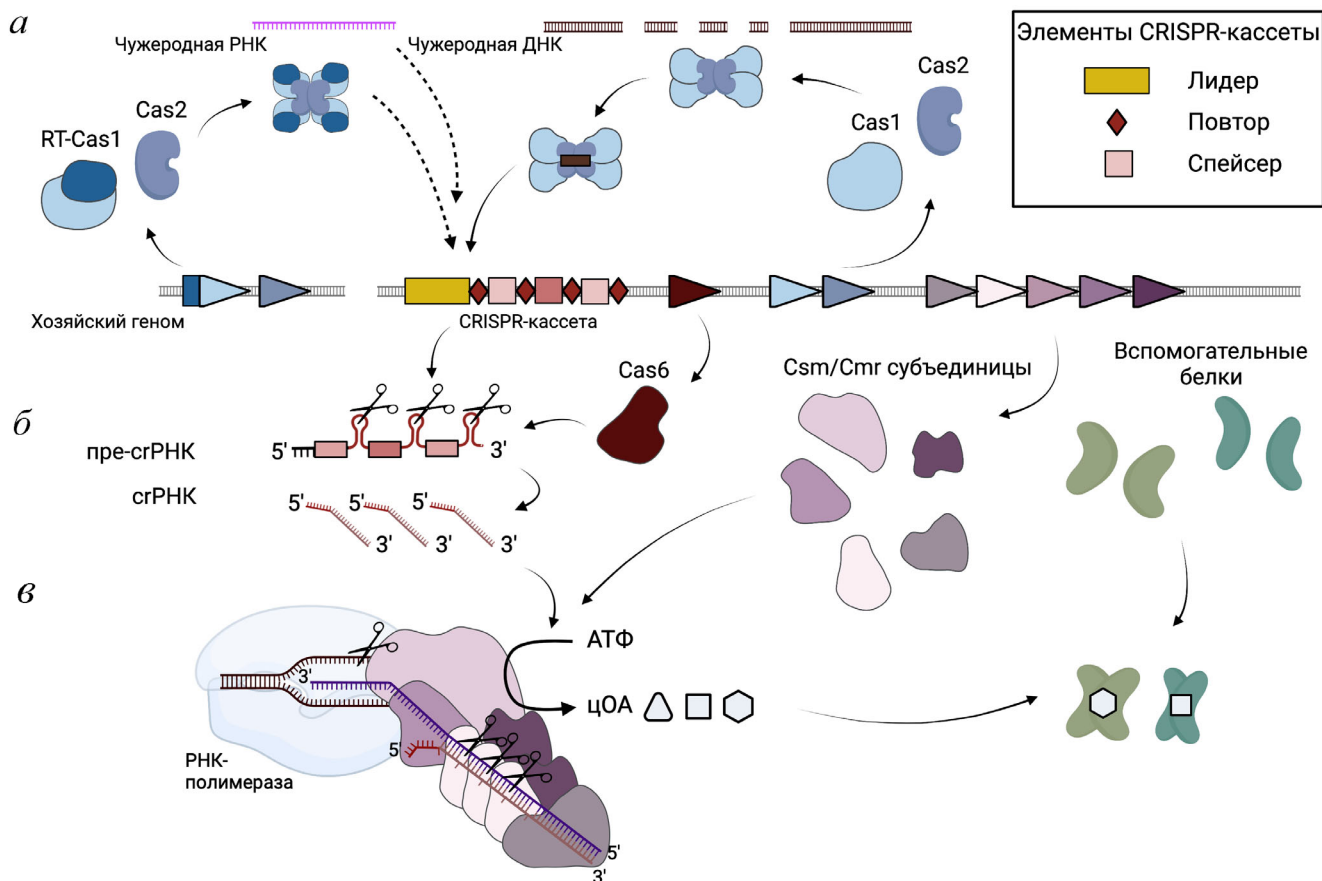


**Рис. 1.** Схема иммунного ответа в системах CRISPR-Cas типа III. *а* — Адаптация — встраивание небольших фрагментов нуклеиновых кислот мобильного генетического элемента в CRISPR-кассету хозяина. В некоторых системах спейсеры могут приобретаться из РНК за счёт активности домена обратной транскриптазы (RT), слитого с белком Cas1. *б* — Экспрессия; созревание малых crRNA и формирование эффекторных комплексов. *в* — Интерференция; специфическое распознавание чужеродной РНК запускает иммунный ответ

мейств других белок-кодирующих генов, ассоциированных с генами предполагаемых полимераз/циклаз, но роль этих белков оставалась неясной. Предполагая, что обнаруженные локусы относятся к новой системе репарации ДНК, Makarova et al. [6] назвали эти белки Repair-Associated Mysterious Proteins, или RAMP. Кроме локусов, кодирующих полимеразу/циклазу и RAMP, Makarova et al. [6] обнаружили ещё одну группу консервативных кластеров генов, которые сейчас известны как системы CRISPR-Cas типа I. Тем не менее ассоциация обнаруженных кластеров с CRISPR-кассетами на тот момент не была установлена. Несколько лет спустя Haft et al. [9] провели масштабный анализ белок-кодирующих генов, ассоциированных с CRISPR-кассетами, и попытались классифицировать эти гены по организации в локусы. Среди обнаруженных локусов CRISPR-Cas Haft et al. [9] описали локусы типа Csm (Crispr Subtype Mycobacterium tuberculosis)

и локусы типа Cmr (Crispr Cas Module RAMP). Между некоторыми белками, закодированными в локусах *csm* и *cmr*, было обнаружено сходство — оба локуса кодируют белки, содержащие Palm-домены (*csm1* и *cmr2*), и как минимум два белка семейства RAMP (*csm3* и *cmr4*). Позже локусы *csm* и *cmr* стали известны как системы типа III-A и типа III-B соответственно [10]. Haft et al. [9] также отметили, что локус *cmr* никогда не бывает единственной системой CRISPR-Cas в прокариотическом геноме. Позже было показано, что в системах CRISPR-Cas типа III-B, как правило, отсутствует модуль адаптации, и поэтому они используют адаптационные модули, закодированные другими системами CRISPR-Cas [5].

Системы CRISPR-Cas типа III независимо изучались в нескольких научных группах, и поначалу результаты этих исследований были противоречивыми. Marraffini et al. [11], исходя из результатов экспериментов *in vivo*, охарактери-

зовали систему CRISPR-Cas типа III-A из *Staphylococcus epidermidis* как специфичную к ДНК. С другой стороны, было показано, что эффекторный комплекс типа III *in vitro* специфически распознают и расщепляют РНК [12, 13]. Хотя сейчас известно, что выводы, сделанные на основе результатов *in vivo*, были неверными, подробный разбор этих исследований важен не только в рамках изучения систем CRISPR-Cas, но и с точки зрения научной методологии. Marraffini et al. [11] для своего эксперимента использовали два штамма *S. epidermidis* и конъюгативную плазмиду, способную реплицироваться в клетках этих бактерий. Один из штаммов содержал систему CRISPR-Cas типа III-A со спейсером, совпадающим по последовательности с участком плазмидного гена *nes*, кодирующего никазу, которая является частью механизма конъюгации. Было показано, что система типа III-A подавляет конъюгативный перенос плазмиды, несущей ген *nes*. Так как последовательность спейсера совпадала с последовательностью кодирующей цепи гена *nes* (т.е. сгРНК не могла распознать смысловой транскрипт за счёт комплементарных взаимодействий), был сделан вывод, что мишенью для системы типа III-A является ДНК, а не РНК. Тем не менее транскрипт *nes* может распознаваться сгРНК, транскрибированными с противоположной цепи CRISPR-кассеты, однако таких сгРНК не обнаружили. Также известно, что для конъюгативного переноса плазмиды экспрессия никазы необходима лишь в клетках донора, и расщепление транскрипта *nes* в клетках реципиента не должно снижать эффективность конъюгации, что дополнительно подтверждает предположение о специфичности систем типа III-A к ДНК. Чтобы окончательно подтвердить ДНК-специфичность системы типа III-A, авторы провели изящный эксперимент, внедрив в последовательность протоспейсера самосплайсирующий интрон и показав, что такая плаزمид избегает иммунного ответа, опосредованного системой типа III-A. Однако они не рассмотрели возможность того, что 1) ген *nes* в клетке транскрибируется и с антисмысловой цепи, 2) иммунитет, опосредованный системами CRISPR-Cas типа III, может запускаться, когда эффектор узнает новосинтезирующиеся РНК. Несколько лет спустя в той же лаборатории показали, что протоспейсеры, закодированные в исследуемых плазмидах, транскрибируются в обоих направлениях, и специфичность систем типа III-A к РНК *in vivo* была окончательно подтверждена [14].

Несмотря на специфичность к молекулам РНК, системы CRISPR-Cas типа III защищают

клетки от вирусов с ДНК-геномами и подавляют трансформацию плазмидами, если ДНК вируса или плазмиды транскрибируется с образованием РНК, комплементарной сгРНК, даже если эти транскрипты-мишени не важны в жизненном цикле вируса или плазмиды [14, 15]. Изучение активностей эффекторных комплексов Csm и Cmr *in vitro* позволило отчасти объяснить этот странный феномен. Большие субъединицы эффекторных комплексов типа III (белки Csm1 и Cmr2, впоследствии названные Cas10), кроме Palm-доменов, содержат HD-домены (названные по присутствующим в них консервативным остаткам гистидина и аспартата) [5]. Белки с HD-доменами присутствуют и в других CRISPR-Cas-системах. Например, белок Cas3 систем типа I содержит HD-домен, обладающий нуклеазной активностью в отношении к одноцепочечной ДНК (оцДНК); в ходе иммунного ответа за счёт активности HD-домена белок Cas3 разрушает ДНК-мишени [16]. В эффекторных комплексах типов III-A [17] и III-B [18, 19] связывание РНК-мишени активирует HD-домены субъединиц Cas10, и такие активированные комплексы способны расщеплять одноцепочечную ДНК *in vitro*. С учётом этих наблюдений была предложена модель «котранскрипционного расщепления ДНК». Согласно этой модели, эффекторы систем типа III распознают новосинтезированные транскрипты. При этом происходит активация HD-доменов субъединиц Cas10, за счёт которых происходит расщепление одонитевой ДНК в области «котранскрипционного пузыря» (рис. 2, а) [17]. Котранскрипционное расщепление ДНК было обнаружено в экспериментах *in vitro* группой Marraffini [20], однако, согласно более поздним данным, наблюдаемое *in vitro* котранскрипционное расщепление ДНК на деле может быть следствием ошибочной интерпретации результатов эксперимента [21]. Вразрез с моделью котранскрипционного расщепления ДНК было показано, что мутации каталитических остатков в HD-доме Cas10 не влияют на подавление трансформации клеток плазмидами, в то время как инактивация Palm белка Cas10 значительно ослабляет антиплазмидный иммунный ответ [22]. Из этих результатов ясно, что, несмотря на все изящество и правдоподобность модели котранскрипционного расщепления ДНК, иммунный ответ систем типа III не может быть сведён только лишь к ней.

Локусы CRISPR-Cas часто содержат гены белков, напрямую не участвующих в процессах приобретения новых спейсеров, созревания сгРНК или формирования эффекторных комплексов. Роль большинства этих вспомогатель-

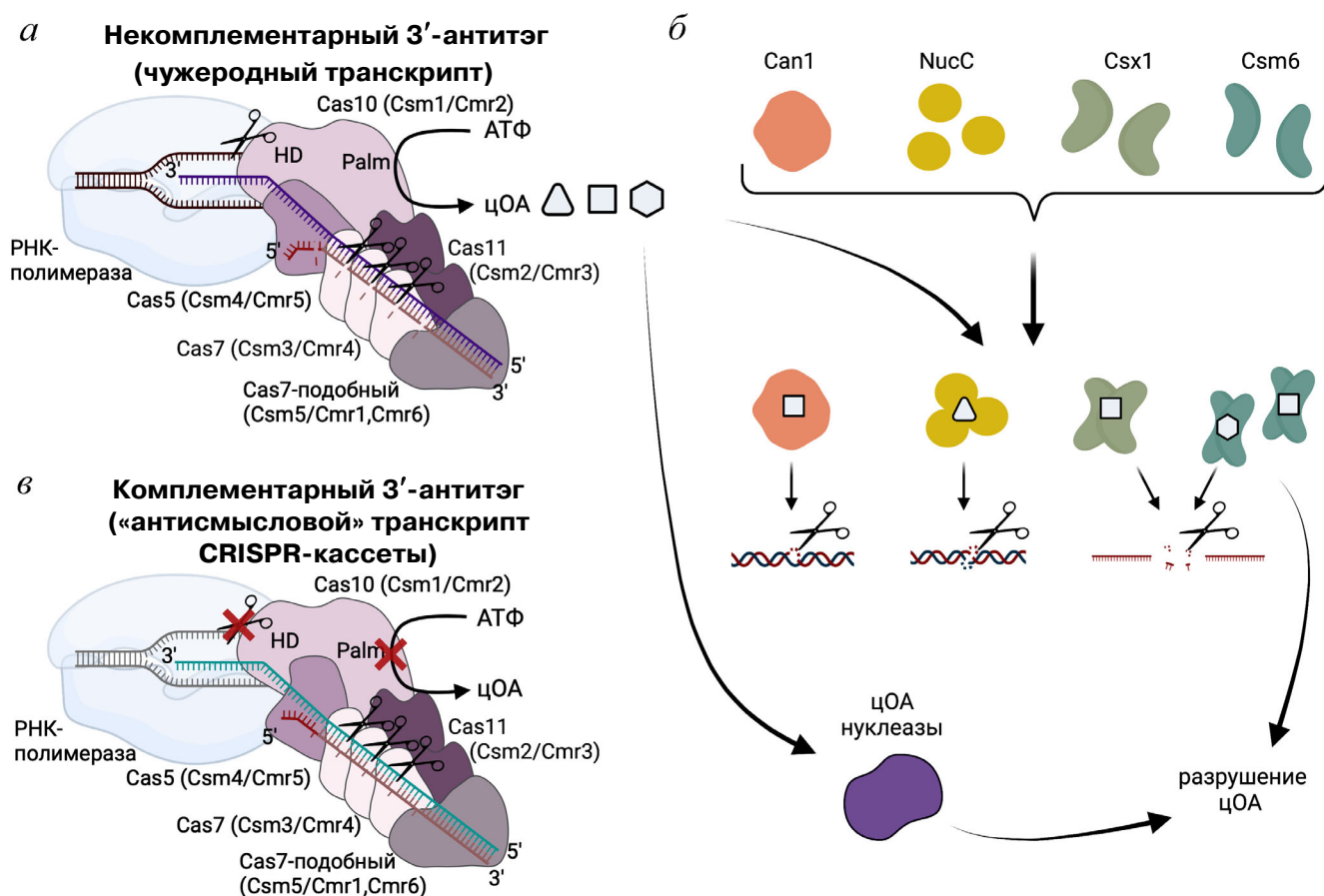


**Рис. 2.** Модель котранскрипционного расщепления ДНК эффекторами типа III с активацией вспомогательных нуклеаз, запускаемых при распознавании мишени. *а* – Распознавание транскрипта, комплементарного crРНК, активирует нуклеазную активность домена HD и полимеразную активность домена Palm субъединицы Cas10. *б* – Циклические олигоаденилаты (цОА), синтезированные за счёт активности Palm-домена, активируют вспомогательные эффекторы, неспецифически расщепляющие ДНК или РНК; активность вспомогательных эффекторов регулируется за счёт деградации цОА специализированными цОА-нуклеазами либо самими вспомогательными эффекторами. *в* – Предотвращение аутоиммунного ответа в системах CRISPR-Cas типа III: при наличии комплементарных взаимодействий между РНК-мишенью и «5'-тэгом» crРНК домены HD и Palm субъединицы Cas10 остаются неактивными

ных генов до сих пор неясна. Некоторые из таких генов кодируют белки, содержащие домен с особым вариантом укладки Россмана, называемым CARF (CRISPR-Cas Associated Rossmann Fold). В этих белках CARF-домены часто слиты с другими доменами с предсказанной РНКазной, ДНКазной или ДНК-связывающей активностями. Поскольку укладка Россмана часто встречается в нуклеотид-связывающих белках, было предположено, что белки с CARF-доменами могут распознавать некие лиганды нуклеотидной природы, активирующие эффекторные домены этих белков [23]. Вспомогательные белки важны для работы систем типа III: было показано, что повреждение генов *csx1* и *csm6*, которые кодируют CARF-домены и часто ассоциированы с оперонами *cas*-систем типа III, значительно снижает способность этих систем подавлять трансформацию плазмиды [15, 22].

В белках Csx1 и Csm6 домены CARF слиты с доменами HEPN (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding) [23]. Белки с HEPN-доменами обычно обладают РНКазной активностью и часто входят в состав различных защитных систем [24]. Некоторые ортологи Csx1 и Csm6 способны расщеплять одноцепочечные РНК *in vitro* за счёт активности HEPN-доменов. Однако обнаруженная РНКазная активность была довольно слабой, поэтому было предположено, что во время иммунного ответа *in vivo* может быть задействована какая-то активация [25, 26]. Впоследствии это предположение полностью подтвердилось – было показано, что при распознавании РНК-мишени эффекторные комплексы типа III катализируют синтез циклических олигоаденилатов (цОА) за счёт полимеразной активности Palm-доменов Cas10 [27, 28]. Эти олигоаденилаты играют роль вторичных

мессенджеров, активируя неспецифическую РНКазную активность белков CARF–HEPN (рис. 2, а, б) [27–29]. Роль неспецифической РНКазной активности белков Csx1/Csm6 в иммунном ответе до сих пор не вполне ясна; предполагается, что результатами такой неспецифической деградации РНК может быть подавление экспрессии вирусных транскриптов, прекращение роста/деления или даже гибель клетки [30, 31]. В последнем случае можно предположить, что подавление инфекции ДНК-вирусами может происходить по механизму abortивной инфекции без привлечения ДНКазной активности эффекторных комплексов систем типа III. Однако, если бы системы типа III функционировали по принципу систем abortивной инфекции, клетки, получившие спейсеры в процессе адаптации, не смогли бы дать потомства. Это соображение подтверждается экспериментами – иммунный ответ, опосредованный системами типа III, позволяет клеткам выжить после инфекции литическими бактериофагами [32].

Поскольку иммунный ответ систем типа III позволяет клеткам выжить после инфекции, активация вспомогательных РНКаз, вызванная цОА, должна быть временной. Существует два наиболее очевидных способа контролировать активность вспомогательных эффекторов – за счёт регуляции синтеза цОА и за счёт их расщепления. Оба пути регуляции были экспериментально подтверждены. Во-первых, синтез цОА, осуществляемый Cas10, активируется при связывании с РНК-мишенью и прекращается при её расщеплении [33, 34]. Во-вторых, были охарактеризованы несколько нуклеаз, способных расщеплять цОА. В некоторых организмах деградация цОА осуществляется специализированными цОА-нуклеазами [35]; в других – белки с доменами CARF–HEPN способны сами деградировать цОА, которые являются их собственными лигандами (рис. 2, б) [36, 37]. Кроме цОА-нуклеаз, задействованных в регуляции иммунного ответа, известна высокоактивная цОА-нуклеаза, кодируемая вирусом, заражающим клетки археи *Sulfolobus*; эта нуклеаза позволяет вирусу обойти иммунный ответ клетки-хозяина, опосредованный системой типа III [38].

Интересно, что цОА-зависимый сигнальный путь прокариотических иммунных систем схож с одним из путей врождённого иммунитета млекопитающих. Присутствие молекул двухнитевой РНК в цитоплазме клеток млекопитающих активирует олигоденилатсинтазу (ОАС), которая превращает молекулы АТФ в 2'-5'-олигоденилаты, активирующие РНКазу L, которая неспецифически расщепляет РНК в цитоплазме [39]. Сходство этих механизмов оказывается

ещё более примечательным, если учесть, что каталитический центр ОАС схож с Palm-доменом [40], а РНКазы L содержат в своём составе вариант HEPN-домена, который и обуславливает рибонуклеазную активность [24]. В последнее время этот путь врождённого иммунитета привлёк к себе много внимания, так как было обнаружено, что некоторые полиморфизмы в локусе, кодирующем ОАС, ассоциированы с дыхательной недостаточностью, вызванной COVID-19; судя по этим данным, вероятно, этот сигнальный путь играет важную роль в иммунном ответе против SARS-Cov-2 [41].

Если роль цОА-пути в иммунном ответе систем CRISPR-Cas типа III относительно понятна, функция HD-домена Cas10 остаётся неясной. В ранних исследованиях было показано, что мутации в каталитических остатках HD-домена белка Cas10 не влияют на опосредованное системой III-A подавление конъюгативного переноса плазмид между клетками *S. epidermidis* [22]. В этой работе эффективность конъюгации отслеживали по числу колоний трансконъюгантов, то есть колоний, образованных клетками, получившими плазмиду в ходе конъюгативного переноса. Но позже было показано, что система типа III-A с инактивированным HD-доменом Cas10 не препятствовала формированию колоний трансконъюгантов, но сильно замедляла их рост, так что такие колонии можно было обнаружить только спустя длительное время инкубации [31]. В случае, когда оба домена (HD и Palm) были инактивированы, интерференции не наблюдалось, и количество и внешний вид колоний трансконъюгантов, несущих таргетируемую и нетаргетируемую плазмиду, были одинаковыми [31]. Так, было установлено, что для эффективного подавления конъюгации требуется совместная активность обоих доменов белка Cas10. На деле, необходимость в цОА-зависимом пути интерференции типа III-A может зависеть от количества РНК-мишени: когда транскрипта, распознаваемого эффектором типа III-A, образуется много, активации HD-домена оказывается достаточно для эффективной интерференции; когда уровень транскрипции протоспейсера низок, необходимы активности обоих доменов белка Cas10. Вероятно, роль неспецифических цОА-активируемых РНКаз в системах типа III состоит в подавлении репликации мобильных генетических элементов, за счёт чего более медленная активность HD-домена Cas10 успевает разрушить их ДНК [31]. Этот механизм иммунного ответа предполагает ко-транскрипционное расщепление ДНК, однако чётких экспериментальных данных, подтверждающих существование этого явления, на теку-

ший момент нет. Котранскрипционное расщепление ДНК было описано лишь в экспериментах *in vitro* всего в одной статье [20]. В этих экспериментах субстраты для *in vitro* транскрипции были получены путём отжига двух комплементарных дезоксиолигонуклеотидов — матричного и нематричного. Однако более поздние исследования показали, что процесс, принятый за котранскрипционное расщепление ДНК, может происходить только в том случае, если олигонуклеотид, соответствующий нематричной, «таргетируемой» цепи ДНК, находится в избытке по отношению к олигонуклеотиду «не таргетируемой» цепи ДНК, комплементарной РНК-транскрипту [21]. Согласно этим исследованиям, в экспериментах Samaï et al. [20] эффекторы типа III расщепляли не ДНК внутри «транскрипционного пузыря», а свободную однонитевую ДНК, присутствующую в реакционной смеси [21]. В качестве альтернативной гипотезы, объясняющей способность систем типа III защищать клетки от мобильных генетических элементов с ДНК-геномами так, чтобы клетки при этом остались в живых, можно предположить, что HD-домен Cas10 может расщеплять одноцепочечную ДНК, которая формируется на промежуточных стадиях репликации некоторых вирусов и плазмид [21]. Таким образом, можно заключить, что, хотя активность HD-домена белка Cas10 необходима для интерференции в системах типа III, роль этой активности остаётся неясной из-за отсутствия данных о мишенях ДНКазного домена Cas10 *in vivo*. В недавнем исследовании было показано, что активность HD-домена Cas10 повышает частоту возникновения мутаций в геноме бактерии, кодирующей систему CRISPR-Cas типа III, что косвенно свидетельствует о том, что HD-домен белка Cas10 способен неспецифически расщеплять клеточную ДНК [42].

Согласно представленным выше результатам, опосредованная системами типа III защита против чужеродной ДНК подразумевает слаженную работу HD- и Palm-доменов белка Cas10 вместе с цОА-активируемыми РНКазами. Однако во многих системах III-типа нередко отсутствуют какие-либо из этих компонентов. Вероятно, такие «неполные» системы либо задействуют какие-то механизмы, компенсирующие отсутствующие компоненты, либо функционируют иным путём.

Один из примеров такой неполной системы — система CRISPR-Cas типа III-B бактерии *Thermus thermophilus*. В этой системе в белке Cas10 отсутствует HD-домен [43]. Однако, поскольку в этом белке присутствует интактный Palm-домен, он все ещё способен активировать

вспомогательные эффекторы за счёт цОА-пути [44]. В локусе типа III-B *T. thermophilus*, помимо РНКаза Csm6, закодирована цОА-активируемая ДНК-никаза Can1, которая, возможно, осуществляет деградацию чужеродной ДНК, компенсируя отсутствие HD-домена Cas10 [45].

В системах CRISPR-Cas типа III-F Palm-домен Cas10 содержит мутации в каталитическом центре и, вероятно, неактивен. В соответствии с этим в локусах типа III-F отсутствуют гены, кодирующие белки с CARF-доменами [4]. Можно предположить, что за счёт активности HD-домена Cas10 системы типа III-F могут обеспечивать по крайней мере частичную защиту от мобильных генетических элементов. Так, было показано, что некоторые «полные» CRISPR-Cas-системы типа III могут защищать клетки от инфекции вирусами даже при удалении из генома хозяина генов, кодирующих цОА-активируемые РНКаза [30].

Системы типа III-E ещё более необычны, поскольку в них полностью отсутствуют гены, кодирующие субъединицы Cas10. Что ещё любопытнее, несколько субъединиц Cas7, которые составляют многосубъединичный сгРНК-связывающий филамент в других системах типа III, в этих системах слиты и формируют один большой многодоменный белок. В локусах типа III-E отсутствуют гены, кодирующие CARF-доменные белки, но в некоторых локусах предсказаны гены, кодирующие каспазоподобные эффекторы [4]. Механизмы действия этих систем до сих пор неясны.

Системы HRAMP (Halobacterial RAMP), биоинформатически предсказанные в геномах архей класса Halobacteria, представляют собой ещё один пример «неполных» локусов, сходных с системами типа III. В состав локусов HRAMP входят так называемый «сигнатурный ген систем HRAMP», гены группы *cas7* и *cas5*. Также эти локусы часто кодируют нуклеазы, содержащие домены DEDDy и HNH. CRISPR-кассеты в этих системах отсутствуют. Функции систем HRAMP на текущий момент неизвестны, однако, исходя из их состава, предполагается, что они могут функционировать как иммунные системы, расщепляющие двухцепочечную ДНК. Гены «сигнатурных белков HRAMP» входят в состав всех известных локусов HRAMP, однако при анализе аминокислотных последовательностей не удавалось обнаружить какие-либо гомологи, не входящие в локусы HRAMP, и функция этих белков остаётся неизвестной [46].

Используя недавно разработанную систему AlphaFold2, предсказывающую пространственные структуры белков, мы обнаружили структурное сходство между сигнатурными бел-

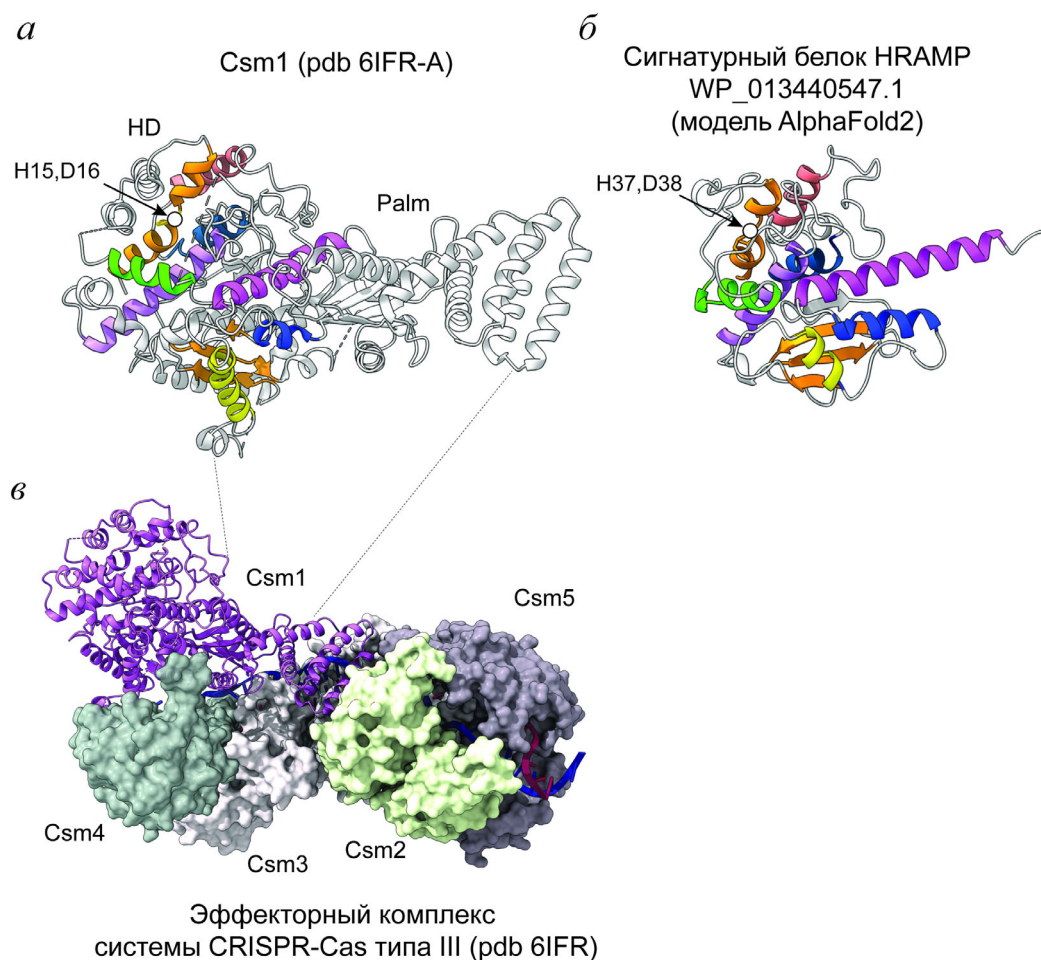


**Рис. 3.** Структурная гомология между сигнальным белком HRAMP и белком Cas10. Структура Csm1 из *Streptococcus thermophilus* (а) и модель сигнального белка HRAMP WP\_013440547.1 из *Halogeometricum borinquense*, предсказанная AlphaFold2 (б), показаны в виде ленточных диаграмм. Элементы со структурным сходством выделены соответствующими цветами. Домены, сходство между которыми отсутствует, показаны светло-серым цветом. Активные центры His–Asp указаны стрелками. в – Белок Csm1 из *S. thermophilus* в составе эффекторного комплекса типа III-A

ками HRAMP и белком Csm1 (белок Cas10 систем типа III-A) (моделирование было проведено с помощью ColabFold AlphaFold2\_mmseqs2 со стандартными параметрами, поиск структурных гомологов был осуществлён на сервере Dali [47–49]; значения Z-коэффициента Dali для предсказанной структуры HRAMP WP\_013440547.1 из *Halogeometricum borinquense* и для структуры Csm1 из *Streptococcus thermophilus* (PDB 6IFR-A) – 10.6). Согласно результатам предсказания, в сигнальном белке HRAMP присутствует HD-домен, очень схожий с HD-доменом в Csm1, содержащий характерный для этого домена активный центр с остатками гистидина и аспартата (рис. 3, а, б). Сигнальный белок HRAMP в два раза меньше белка Csm1, и в нём нет доменов, необходимых для взаимодействия с белками Csm2 и Csm4, которые входят в системы CRISPR-Cas типа III-A, но отсут-

ствуют в системах HRAMP (рис. 3, а–в). Сигнальный белок HRAMP также содержит домен, схожий с Palm, но этот домен значительно меньше Palm-домена Csm1 и, вероятно, неактивен. В соответствии с этим предположением, в локусах систем HRAMP отсутствуют гены белков с CARF-доменами; тем не менее эта гипотеза все же требует экспериментальной проверки.

Поскольку ближайшими гомологами белков Cas7 систем HRAMP являются белки Cas7 из систем CRISPR-Cas типа III, было сделано предположение о родстве этих систем [46]. Структурная гомология между сигнальными белками HRAMP и белками Cas10 типа III также подтверждает это родство. Возможно, системы HRAMP произошли от систем типа III, схожих с современными, а CRISPR-кассеты и модули адаптации были утрачены в ходе эволюции. В качестве альтернативной гипотезы мож-

но предположить, что системы HRAMP произошли от предковых систем типа III, которые существовали ещё до появления CRISPR-кассет и до приобретения адаптационных модулей. В последнем случае системы HRAMP могут быть молекулярными реликтами, а их изучение может прояснить функции древних прототипических систем типа III.

Хотя наиболее распространёнными вспомогательными эффекторами в системах типа III являются CARF-доменные РНКазы семейства HEPN, активируемые циклическими олигоаденилатами [4], в некоторых системах типа III используются и другие цОА-активируемые эффекторы.

Недавно был охарактеризован один из таких необычных вспомогательных эффекторов, ассоциированных с системами типа III. Активируемый циклическим тетрааденилатом белок Card1, закодированный в локусе типа III-A бактерии *Treponema succinifaciens*, обладает нуклеазной активностью по отношению к одноцепочечным ДНК и РНК *in vitro*. Однако, поскольку активация Card1 в клетках *Staphylococcus aureus* не приводит к заметным изменениям в транскрипте [50], РНКазная активность этого белка либо подавлена *in vivo*, либо является высокоспецифичной и не вызывает массовой деградации транскриптов. Экспрессия Card1 компенсирует делецию гена *csmb* в системе типа III-A из *S. epidermidis*, восстанавливая способность клеток противостоять фаговой инфекции. Однако штаммы с каталитически неактивным HD-доменом Cas10 не могли выжить после инфекции даже при наличии Card1 [50], что говорит о том, что ДНКазной активности Card1 недостаточно для эффективного иммунного ответа. Было показано, что для того, чтобы клетки полностью избавились от плазмиды, содержащей транскрибируемый протоспейсер, требуется активность как HD-домена Cas10, так и Card1, что косвенно подтверждает специфичность нуклеазной активности HD-домена Cas10 к ДНК, несущей протоспейсер [50].

### ПРИБРЕТЕНИЕ СПЕЙСЕРОВ В СИСТЕМАХ CRISPR-Cas ТИПА III

Практически во всех системах CRISPR-Cas, включая тип III, интеграция новых спейсеров в CRISPR-кассету производится комплексом, состоящим из консервативных белков Cas1 и Cas2 (рис. 1, а) [4]. Интеграционные комплексы Cas1–Cas2 способны захватывать короткие фрагменты ДНК и встраивать их в CRISPR-кассету [51]. Происхождение этих фрагментов

ДНК остаётся малоизученным, однако для систем типов I и II было показано, что такие фрагменты могут образовываться в ходе деградации ДНК комплексами RecBCD, или AddAB [52, 53], или, в случае «праймированной адаптации» в системах типа I, процессивной нуклеазой Cas3 [54]. Иммунный ответ систем типа III против плазмид и вирусов с ДНК-геномами требует транскрипции протоспейсера, поэтому для клеток выгодны механизмы, обеспечивающие преимущественное приобретение спейсеров из транскрипционно активных участков мобильных генетических элементов. Модули адаптации некоторых систем типа III содержат белки Cas1, слитые с доменами обратной транскриптазы (RT), которые могут приобретать новые спейсеры напрямую из РНК (рис. 1, а) [55, 56]. Было показано, что при оверэкспрессии компонентов адаптации *cas1::RT–cas2* происходит приобретение спейсеров из РНК, предпочтительно из высокопредставленных транскриптов [57, 58]. Однако приобретённые спейсеры встраиваются в CRISPR-кассету в обеих ориентациях, так что, вероятно, лишь половина приобретённых из РНК спейсеров может обеспечить эффективный иммунный ответ.

Механизмы приобретения спейсеров из РНК на текущий момент плохо изучены. Комплекс белков Cas1::RT–Cas2 из *Marinomonas mediterranea* в условиях *in vitro* способен присоединять 3'-концы молекул РНК к 5'-концам повторов в молекулах ДНК, содержащих CRISPR-кассету. Образующиеся гибридные молекулы РНК–ДНК могли служить матрицами для обратной транскрипции, катализируемой RT-доменом белка Cas1::RT [57]. В условиях этих экспериментов молекулы РНК могут присоединяться к обеим сторонам первого повтора CRISPR-касеты [57], что согласуется с наблюдаемым в экспериментах *in vivo* отсутствием предпочтения к ориентации спейсеров относительно цепи транскрипта. С другой стороны, белковый комплекс Cas1::RT–Cas2 из *Thiomicrospira* способен присоединять молекулы РНК к содержащим CRISPR-кассету фрагментам ДНК *in vitro*, но не может преобразовывать такие промежуточные продукты в удлинённые CRISPR-касеты. Это может означать, что *in vivo* для такого преобразования либо требуются дополнительные факторы, либо синтез кДНК происходит до интеграции пре-спейсеров в CRISPR-кассету [59].

Домен обратной транскриптазы, входящий в состав некоторых адаптационных модулей, вероятно, играет скорее вспомогательную роль – белок Cas1-RT с инактивированным RT-доменом способен встраивать спейсеры из

ДНК подобно обычным белкам CasI [57]. Более того, большинство локусов типа III кодируют стандартные белки CasI [57] и не кодируют белки с RT-доменами. В таких системах новые спейсеры должны приобретаться из ДНК, и этот процесс не должен зависеть от транскрипции протоспейсера, если только в этих системах не используются другие, ещё не описанные механизмы, позволяющие приобретать спейсеры из транскрипционно активных участков. Модуль адаптации систем типа III бактерии *T. thermophilus* содержит обычные гены *cas1-cas2*, а в геноме бактерии не обнаружено никаких белков с RT-доменами. Тем не менее при адаптации спейсеров в процессе инфекции литическим бактериофагом наблюдается крайне неравномерное распределение приобретённых спейсеров: практически все выжившие клетки экспрессируют сгРНК комплементарные вирусным транскриптам. Однако такой состав приобретённых спейсеров является результатом отбора сгРНК на их способность защищать клетки от инфекции фагом и не связан с какой-либо специфичностью механизмов адаптации [32].

### ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ АУТОИММУННОГО ОТВЕТА В СИСТЕМАХ CRISPR-Cas ТИПА III

Эффекторные комплексы CRISPR-Cas распознают нуклеиновые кислоты, комплементарные спейсерной части сгРНК. Поскольку сгРНК образуются из CRISPR-кассет, мишенью эффекторов также может оказаться сама геномная ДНК (или, в случае систем с РНК-мишенями, «антисмысловые» транскрипты CRISPR-кассет). Такие «аутоиммунные» взаимодействия вредны для клетки, и потому должны существовать механизмы, позволяющие их предотвратить. Для распознавания мишени ДНК-специфичными системами CRISPR-Cas (к которым относятся системы типов I, II и V) необходимы короткие (порядка нескольких нуклеотидов) вырожденные последовательности, расположенные в ДНК мишени рядом с протоспейсерами, но отсутствующие вблизи спейсеров в CRISPR-кассетах — так называемые РАМ (Protospacer Adjacent Motifs) [60]. Эффекторные комплексы «сканируют» двухцепочечные молекулы ДНК и после распознавания РАМ инициируют плавление дуплекса ДНК с последующим внедрением сгРНК и формированием R-петли [61–63]. В системах типа III механизм предотвращения аутоиммунного ответа устроен совершенно иначе. Эффекторы типа III распознают и расщепляют любые молекулы РНК, комп-

лементарные спейсерной части сгРНК, но для активации HD- и Palm-доменов субъединицы Cas10 требуется отсутствие комплементарных взаимодействий между мишенью и происходящим из повтора 5'-концевым участком («5'-тэгом») сгРНК (рис. 2, в) [17, 64, 65]. Любопытно, что такой же принцип избегания аутоиммунного ответа используется в РНК-специфичных CRISPR-Cas-системах типа VI [66, 67].

Можно задаться вопросом, почему все ДНК-специфичные системы CRISPR-Cas избегают аутоиммунного ответа за счёт распознавания РАМ, в то время как РНК-специфичные системы для этой цели используют другие механизмы. Теоретически, стратегия «тэг-антитэг» должна подходить и для ДНК-специфичных систем (вообще говоря, механизм «тэг-антитэг» был обнаружен в системах типа III, когда предполагалось, что их мишенью является ДНК [64]). Однако в ДНК-специфичных системах используются лишь РАМ-зависимые механизмы, которые независимо возникли как минимум трижды [68]. Кроме того, согласно текущим данным, системы типа III являются предшественниками всех известных систем класса I [68]. Если исходить из этого эволюционного сценария, в системах типа I предковая стратегия избегания аутоиммунитета, основанная на взаимодействиях «тэг-антитэг», должна была смениться на РАМ-зависимый механизм.

Такое предпочтение к РАМ-зависимым механизмам в ДНК-специфичных системах может объясняться кинетикой распознавания мишени эффекторными комплексами. В одноцепочечных молекулах РНК нуклеотидные основания экспонированы, и молекулы сгРНК в составе эффекторных комплексов могут взаимодействовать с РНК-мишенями напрямую. Напротив, в двухцепочечной ДНК комплементарное взаимодействие с сгРНК невозможно, по крайней мере, на начальном этапе. В этом случае для осуществления комплементарных взаимодействий требуется локальное плавление дуплекса ДНК, что существенно замедляет процесс поиска мишени. Движущая сила для начала плавления обеспечивается энергией связывания белковых компонентов эффектора и дополнительно взаимодействием с двухцепочечной РАМ-последовательностью. Поскольку плавление дуплекса ДНК и формирование R-петли происходит только после распознавания РАМ, это ограничивает количество потенциальных мишеней по крайней мере на порядок, ускоряя тем самым поиск протоспейсера. Таким образом, можно предположить, что основная причина использования РАМ заключается не столько в избегании аутоиммунных реакций, сколько в

ускорении поиска протоспейсеров в двухцепочечной ДНК, столь важном для эффективного иммунного ответа.

### ПРОИСХОЖДЕНИЕ СИСТЕМ CRISPR-Cas ТИПА III

Иммунный ответ в системах CRISPR-Cas типа III требует скоординированного взаимодействия нескольких сложных механизмов — приобретения новых спейсеров, созревания *cr*ПНК, сборки эффекторных комплексов, распознавания мишени, синтеза сигнальных соединений, активации вспомогательных эффекторов и регуляции всех вышеперечисленных процессов. При рассмотрении таких сложных систем любой человек рано или поздно задаётся вопросом: «Как же все это смогло возникнуть?»

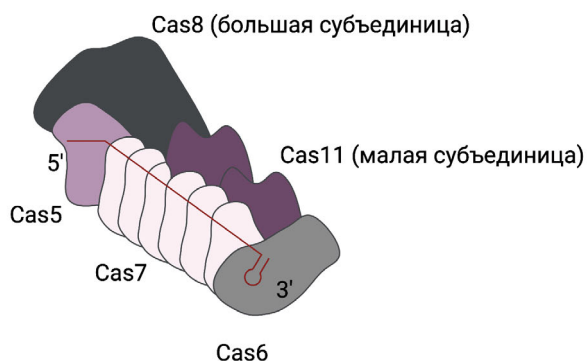
В геномах прокариот можно обнаружить гомологи некоторых генов *cas*, не ассоциированные с системами CRISPR-Cas, и анализ таких генов отчасти прояснил эволюционную историю CRISPR-Cas-систем. Оказалось, что некоторые не ассоциированные с системами CRISPR-Cas гены *cas1* принадлежат к ранее неизвестному семейству мобильных генетических элементов, названных каспозонами, которые используют белки Cas1 для собственной интеграции/эксцизии [69, 70]. Механизм интеграции каспозонов схож с механизмом интеграции новых спейсеров в CRISPR-кассеты. По всей видимости, CRISPR-ассоциированные белки Cas1 произошли от интеграз каспозонов, а повторы CRISPR могли произойти от фланкирующих каспозоны концевых повторов [68, 70]. Наряду с белками Cas1 каспозоны также кодируют гомологи белков Cas4 [69], участвующие в процессе

приобретения новых спейсеров в ряде систем CRISPR-Cas [51].

Другим важным компонентом комплекса интеграции спейсеров является белок Cas2, который гомологичен нуклеазным токсинам семейства VapD, и, вероятно, происходит от соответствующих токсин-антитоксिनных систем [71]. В комплексе интеграции белок Cas2 выполняет структурные функции, скрепляя друг с другом димеры Cas1, однако во многих системах белки Cas2 сохраняют нуклеазную активность, хотя она не является необходимой для адаптации [72].

Эволюционная история компонентов эффекторных комплексов остаётся куда менее ясной. В этом обзоре будет рассмотрен только сценарий происхождения систем CRISPR-Cas класса 1, включающего типы I, III и IV. Эффекторные комплексы систем класса 1 имеют сходную архитектуру. Кроме того, между некоторыми субъединицами этих комплексов прослеживается гомология, что позволяет предположить их общее происхождение (рис. 4). Центральная часть эффекторов типов I и III представляет собой филамент, состоящий из молекулы *cr*ПНК, покрытой несколькими субъединицами Cas7, находящимися в комплексе с малыми субъединицами Cas11; 5'-конец *cr*ПНК связан с белком семейства Cas5. Большие субъединицы (Cas8 в системе типа I и Cas10 в системе типа III) располагаются вблизи 5'-конца *cr*ПНК [73, 74]. Созревание *cr*ПНК в системах типов I и III проходит при участии белков Cas6, которые распознают вторичные структуры, образованные элементами повторов в пре-*cr*ПНК [75]. Хотя эффекторные комплексы систем типа IV на текущий момент плохо исследованы, известно, что в их основе также лежит филамент из нескольких субъединиц Cas7, связанных с *cr*ПНК [76]; в локусах

Эффектор систем типа I



Эффектор систем типа III

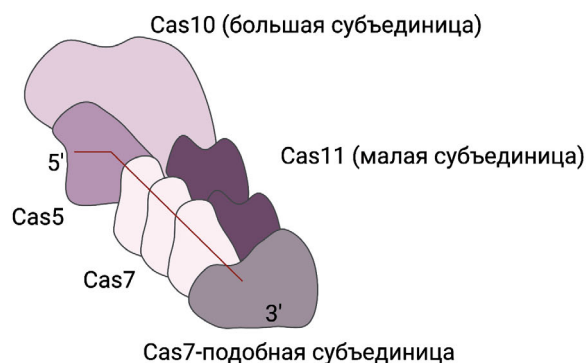


Рис. 4. Сравнение структур эффекторов типа I и типа III; гомологичные белки изображены одинаковыми цветами

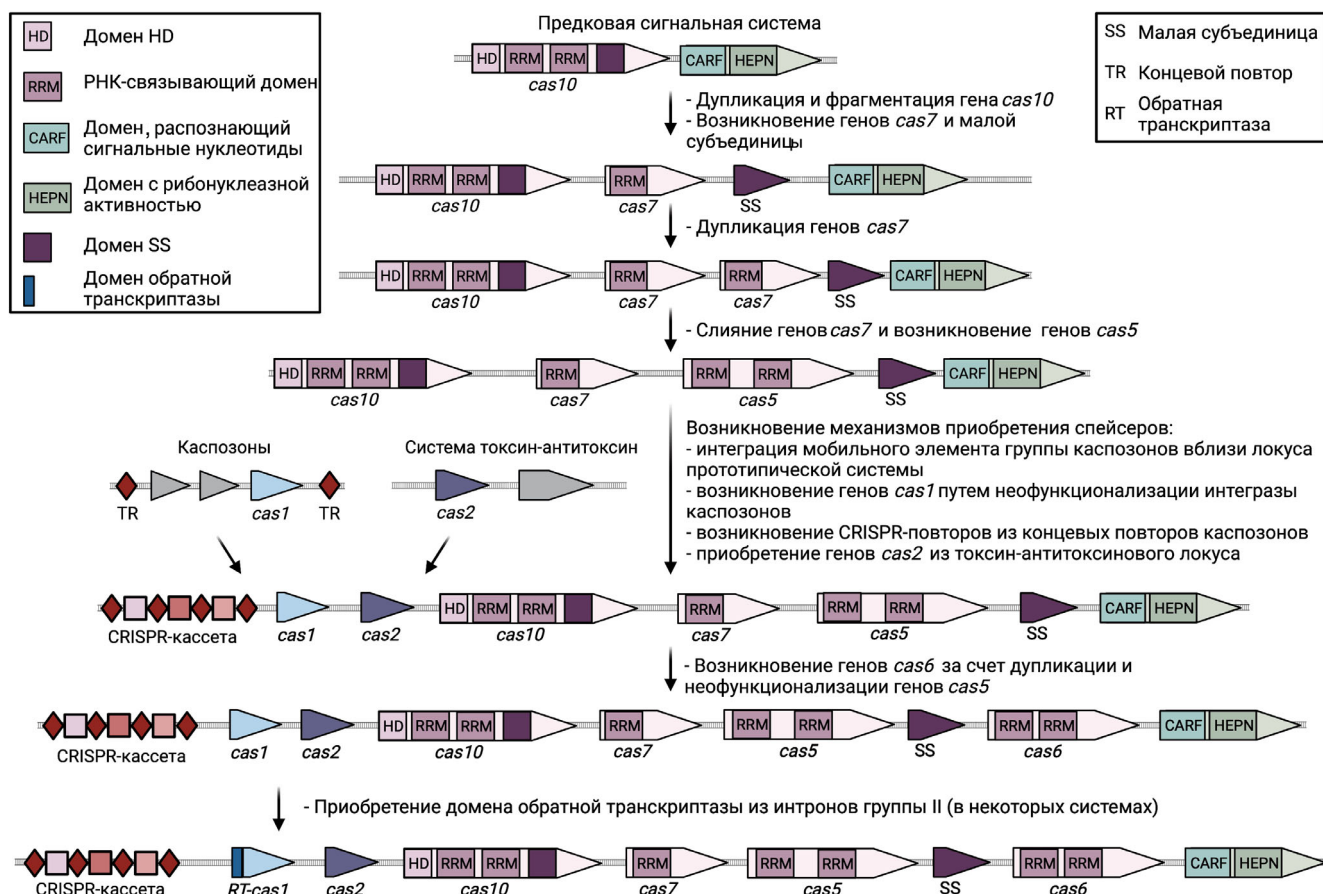


Рис. 5. Предлагаемая модель происхождения систем CRISPR-Cas III типа. Адаптировано из статьи Koonin и Makarova [68]

типа IV также закодированы гомологи белков Cas5 и Cas6 [4]. Главные компоненты эффекторов типов I и III – белки Cas10, Cas5, Cas7 и Cas6 обладают структурным сходством и содержат домены с RRM-укладкой [68, 77]. Кроме того, белки малых субъединиц Cas11 систем типа I имеют структурное сходство с C-концевым доменом Cas10 систем типа III [77].

Исходя из перечисленных сведений, Koonin и Makarova [68] предложили сценарий происхождения систем CRISPR-Cas класса I (рис. 5). Согласно этому сценарию системы типа III, несмотря на всю свою сложность, являются предковыми по отношению ко всем известным системам класса I [4, 68, 77]. Предполагается, что эффекторы класса I произошли от гипотетической сигнальной системы, состоящей из Cas10-подобной полимеразы/циклазы и эффекторного белка CARF–HEPN. Эта сигнальная система могла производить вторичные мессенджеры нуклеотидной природы (вероятно, циклические олигоаденилаты) в ответ на стресс или какие-то другие сигналы окружающей среды с

последующей активацией РНКазной активности белка CARF–HEPN [4]. Подобные локусы, кодирующие гомологи Cas10, слитые с доменами CARF–HEPN, были предсказаны биоинформатически [78], но на текущий момент ни одна из таких систем не была экспериментально охарактеризована. Дупликация предкового гена Cas10-подобного белка с последующим разбиением могла привести к появлению предковых белков Cas7 и Cas11. Гены, кодирующие Cas5 и Cas6, вероятно, возникли в результате слияния двух *cas7*-подобных генов, поскольку все эти гены имеют специфический структурный мотив, отсутствующий в белках Cas10 [68]. Наконец, приобретение компонентов адаптационного модуля от каспозонов и токсин-антитоксинового систем привело к появлению функциональной адаптивной иммунной системы [68].

О первоначальных функциях предковых сигнальных систем, состоящих из белка Cas10 и эффекторов CARF–HEPN, и о том, какие стимулы активировали полимеразную/циклазную активность прототипического белка Cas10, мож-

но лишь предполагать. Функции прототипических систем типа III, существовавших до приобретения модуля адаптации, также неизвестны. Тем не менее известны отдельные варианты систем класса I, которые не ассоциированы с CRISPR-кассетами [46]; исследование этих систем, вероятно, может помочь выявить функции предковых эффекторов класса I. Известно, что эффекторно-комплексные системы типа IV при гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* преимущественно связывают малые РНК, транскрибируемые с плазмид, несмотря на присутствие функциональных компонентов созревания сгРНК и транскрибируемой CRISPR-кассеты [79]. Можно предположить, что древние прототипические эффекторы типа III также могли связывать транскрипты мобильных генетических элементов и использовать их для распознавания мишеней, функционируя как примитивная и малоэффективная иммунная система, сходная с современными прокариотическими белками-аргонатами [80, 81]. Кроме того, Palm-домен Cas10 имеет сходство с каталитическим доменом фермента Hg1 — необычной 3'-5' РНК-полимеразой, необходимой для созревания гистидиновой тРНК [8]. Учитывая этот факт и предполагая, что РНК-связывающие белки Cas7 произошли от RRM-домена Cas10, можно предположить, что предковый белок Cas10 обладал РНК-связывающей и РНК-полимеразной активностью и мог быть частью системы, участвующей в синтезе, репарации и/или созревании молекул РНК. Функция этой Cas10-РНК-полимеразы со временем могла специализироваться для синтеза сигнальных соединений. Лиганды, способные активировать полимеразную активность древнего белка Cas10, не известны, однако, учитывая, что древний Cas10 мог обладать РНК-связывающей активностью, можно предположить, что такими лигандами должны быть молекулы РНК. Хотя достаточно трудно вообразить, какие молекулы РНК могли активировать иммунный ответ в такой системе, стоит отметить, что многие мобильные элементы, в том числе и некоторые каспозоны, используют гены тРНК в качестве мишеней для интеграции [69, 82]. Поскольку эффекторы типа IV связывают и тРНК [83], можно предположить, что до приобретения адаптационных модулей предковые системы типа III могли распознавать транскрипты генов тРНК, повреждённые вставками мобильных генетических элементов.

Защитные системы, которые синтезируют сигнальные вещества нуклеотидной природы в ответ на определенные стимулы, широко распространены среди всех клеточных организмов.

Помимо описанного цОА-пути в системах типа III и эукариотической системы ОАС-РНКазы L, стоит упомянуть большую группу цГАС/DncV-подобных нуклеотидилтрансфераз. У животных синтаза циклического ГМФ-АМФ (цГАС) производит молекулы циклического ГМФ-АМФ в ответ на присутствие ДНК в цитозоле. Циклический ГМФ-АМФ активирует сигнальный каскад, стимулирующий экспрессию ряда генов, вовлечённых в иммунный ответ [84]. В геномах прокариот обнаружены многочисленные гомологи цГАС, многие из них ассоциированы с генами различных эффекторов, такими как нуклеазы, фосфолипазы и трансмембранные белки [85–88]. В таких защитных системах передача сигнала между сенсорами (циклазами) и эффекторами осуществляется малыми диффундирующими молекулами, что позволяет существование большого количества пар сенсор/эффектор и взаимосвязей между различными системами. Любопытно, что некоторые из цГАС/DncV-подобных циклаз производят циклические олигоаденилаты и активируют цОА-чувствительные эффекторы [88]; кроме того, некоторые из таких эффекторов активируются и в ходе иммунного ответа в системах CRISPR-Cas типа III [89, 90].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Системы III типа, будучи самыми сложными из всех известных систем CRISPR-Cas, по-видимому, являются предковыми по отношению к системам класса I. Если учесть, что системы класса I являются самыми распространёнными среди прокариот, системы типа III, вероятно, также являются самыми древними системами CRISPR-Cas. В течение долгого времени механизм работы систем типа III оставался малоизвестным. Хотя открытие сигнального пути, связывающего эффекторные комплексы и вспомогательные нуклеазы, во многом прояснило механизмы иммунного ответа в системах типа III, некоторые аспекты работы этих систем все ещё неясны. Хотя ДНКазная активность HD-домена Cas10 необходима для иммунного ответа, до сих пор неизвестно, какие мишени она расщепляет в клетке. Вспомогательные РНКазы Csm6 и Csx1 были охарактеризованы как неспецифические в экспериментах *in vitro*, но до сих пор нет данных об их специфичности *in vivo*. Существует множество генов, связанных с системами CRISPR-Cas типа III, но многие из них до сих пор не охарактеризованы экспериментально. Помимо полных систем типа III, в ходе биоинформатического анализа была предсказана

группа упрощённых RAMP-содержащих локусов; эти системы представляют интерес сами по себе, но они также могут представлять собой промежуточные звенья, отражающие эволюционную историю систем CRISPR-Cas типа III. В частности, обнаруженная нами структурная гомология между сигнатурными белками HRAMP и белками Cas10 систем типа III позволяет предположить, что системы HRAMP произошли от существующих систем типа III или их предков. Наконец, ещё предстоит охарактеризовать активности и биологические функции современных сигнальных систем Cas10-CARF-HERN. Таким образом, существенная часть разнообразия систем CRISPR-Cas типа III и механизмов работы этих систем остаётся неизученной, и многое из этого ещё предстоит открыть.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90147, М.В.К.), Российского научного фонда (гранты №№ 19-74-00124, Д.Н.А и 21-14-00122, Я.В.Ф.), гранта Президента Российской Федерации (грант № МК-3793.2021.1.4, Я.В.Ф.) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2019-1661).

**Благодарность.** Мы благодарим Светлану Белухину за помощь в работе над текстом.

**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

- Bennett, C. H. (1979) Dissipation-error tradeoff in proof-reading, *Biosystems*, **11**, 85-91.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I., and Katsnelson, M. I. (2017) Inevitability of the emergence and persistence of genetic parasites caused by evolutionary instability of parasite-free states, *Biol. Direct*, **12**, 31.
- Barrangou, R., and Horvath, P. (2017) A decade of discovery: CRISPR functions and applications, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17092.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67-83.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., et al. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 722-736.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 482-496.
- Aravind, L., and Koonin, E. V. (1999) DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1609-1618.
- Anantharaman, V., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2010) Presence of a classical RRM-fold palm domain in Thg1-type 3'-5' nucleic acid polymerases and the origin of the GGDEF and CRISPR polymerase domains, *Biol. Direct*, **5**, 43.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., and Nelson, K. E. (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes, *PLoS Comput. Biol.*, **1**, e60.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., et al. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 467-477.
- Marraffini, L. A., and Sontheimer, E. J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA, *Science*, **322**, 1843-1845.
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., et al. (2009) RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex, *Cell*, **139**, 945-956.
- Zhang, J., Rouillon, C., Kerou, M., Reeks, J., Brugger, K., et al. (2012) Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity, *Mol. Cell*, **45**, 303-313.
- Goldberg, G. W., Jiang, W., Bikard, D., and Marraffini, L. A. (2014) Conditional tolerance of temperate phages via transcription-dependent CRISPR-Cas targeting, *Nature*, **514**, 633-637.
- Deng, L., Garrett, R. A., Shah, S. A., Peng, X., and She, Q. (2013) A novel interference mechanism by a type IIIB CRISPR-Cmr module in *Sulfolobus*, *Mol. Microbiol.*, **87**, 1088-1099.
- Gong, B., Shin, M., Sun, J., Jung, C.-H., Bolt, E. L., et al. (2014) Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16359-16364.
- Kazlauskienė, M., Tamulaitis, G., Kostiuk, G., Venclovas, Č., and Siksnys, V. (2016) Spatiotemporal control of Type III-A CRISPR-Cas immunity: coupling DNA degradation with the target RNA recognition, *Mol. Cell*, **62**, 295-306.
- Elmore, J. R., Sheppard, N. F., Ramia, N., Deighan, T., Li, H., et al. (2016) Bipartite recognition of target RNAs activates DNA cleavage by the type III-B CRISPR-Cas system, *Genes Dev.*, **30**, 447-459.
- Estrella, M. A., Kuo, F.-T., and Bailey, S. (2016) RNA-activated DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas effector complex, *Genes Dev.*, **30**, 460-470.
- Samai, P., Pyenson, N., Jiang, W., Goldberg, G. W., Hatoum-Aslan, A., and Marraffini, L. A. (2015) Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during Type III CRISPR-Cas immunity, *Cell*, **161**, 1164-1174.
- Liu, T. Y., Liu, J.-J., Aditham, A. J., Nogales, E., and Doudna, J. A. (2019) Target preference of Type III-A CRISPR-Cas complexes at the transcription bubble, *Nat. Commun.*, **10**, 3001.
- Hatoum-Aslan, A., Maniv, I., Samai, P., and Marraffini, L. A. (2014) Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system, *J. Bacteriol.*, **196**, 310-317.
- Makarova, K. S., Anantharaman, V., Grishin, N. V., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2014) CARF and WYL domains: ligand-binding regulators of prokaryotic defense systems, *Front. Genet.*, **5**, 102.
- Anantharaman, V., Makarova, K. S., Burroughs, A. M., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2013) Comprehensive

- analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing, *Biol. Direct*, **8**, 15.
25. Sheppard, N. F., Glover, C. V. C., 3rd, Terns, R. M., and Terns, M. P. (2016) The CRISPR-associated Csx1 protein of *Pyrococcus furiosus* is an adenosine-specific endoribonuclease, *RNA*, **22**, 216-224.
  26. Niewoehner, O., and Jinek, M. (2016) Structural basis for the endoribonuclease activity of the type III-A CRISPR-associated protein Csm6, *RNA*, **22**, 318-329.
  27. Niewoehner, O., Garcia-Doval, C., Rostøl, J. T., Berk, C., Schwede, F., et al. (2017) Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers, *Nature*, **548**, 543-548.
  28. Kazlauskienė, M., Kostiuk, G., Venclovas, Č., Tamulaitis, G., and Siksnys, V. (2017) A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems, *Science*, **357**, 605-609.
  29. Han, W., Stella, S., Zhang, Y., Guo, T., Sulek, K., et al. (2018) A type III-B Cmr effector complex catalyzes the synthesis of cyclic oligoadenylate second messengers by cooperative substrate binding, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 10319-10330.
  30. Jiang, W., Samai, P., and Marraffini, L. A. (2016) Degradation of phage transcripts by CRISPR-associated RNases enables type III CRISPR-Cas immunity, *Cell*, **164**, 710-721.
  31. Rostøl, J. T., and Marraffini, L. A. (2019) Non-specific degradation of transcripts promotes plasmid clearance during type III-A CRISPR-Cas immunity, *Nat. Microbiol.*, **4**, 656-662.
  32. Artamonova, D., Karneyeva, K., Medvedeva, S., Klimuk, E., Kolesnik, M., et al. (2020) Spacer acquisition by Type III CRISPR-Cas system during bacteriophage infection of *Thermus thermophilus*, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 9787-9803.
  33. Nasef, M., Muffly, M. C., Beckman, A. B., Rowe, S. J., Walker, F. C., et al. (2019) Regulation of cyclic oligoadenylate synthesis by the Cas10-Csm complex, *RNA*, **25**, 948-962.
  34. Rouillon, C., Athukoralage, J. S., Graham, S., Grischow, S., and White, M. F. (2018) Control of cyclic oligoadenylate synthesis in a type III CRISPR system, *Elife*, **7**, e36734.
  35. Athukoralage, J. S., Rouillon, C., Graham, S., Grischow, S., and White, M. F. (2018) Ring nucleases deactivate type III CRISPR ribonucleases by degrading cyclic oligoadenylate, *Nature*, **562**, 277-280.
  36. Garcia-Doval, C., Schwede, F., Berk, C., Rostøl, J. T., Niewoehner, O., et al. (2020) Activation and self-inactivation mechanisms of the cyclic oligoadenylate-dependent CRISPR ribonuclease Csm6, *Nat. Commun.*, **11**, 1596.
  37. Athukoralage, J. S., Graham, S., Grischow, S., Rouillon, C., and White, M. F. (2019) A type III CRISPR ancillary ribonuclease degrades its cyclic oligoadenylate activator, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2894-2899.
  38. Athukoralage, J. S., McMahon, S. A., Zhang, C., Grischow, S., Graham, S., et al. (2020) An anti-CRISPR viral ring nuclease subverts type III CRISPR immunity, *Nature*, **577**, 572-575.
  39. Hornung, V., Hartmann, R., Ablasser, A., and Hopfner, K.-P. (2014) OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 521-528.
  40. Sarkar, S. N., Ghosh, A., Wang, H. W., Sung, S. S., and Sen, G. C. (1999) The nature of the catalytic domain of 2'-5'-oligoadenylate synthetases, *J. Biol. Chem.*, **274**, 25535-25542.
  41. Pairo-Castineira, E., Clohisey, S., Klaric, L., Bretherick, A. D., Rawlik, K., et al. (2021) Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19, *Nature*, **591**, 92-98.
  42. Mo, C. Y., Mathai, J., Rostøl, J. T., Varble, A., Banh, D. V., and Marraffini, L. A. (2021) Type III-A CRISPR immunity promotes mutagenesis of staphylococci, *Nature*, **592**, 611-615.
  43. Staals, R. H. J., Agari, Y., Maki-Yonekura, S., Zhu, Y., Taylor, D. W., et al. (2013) Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*, *Mol. Cell*, **52**, 135-145.
  44. Steens, J. A., Zhu, Y., Taylor, D. W., Bravo, J. P. K., Prinsen, S. H. P., et al. (2021) SCOPE enables type III CRISPR-Cas diagnostics using flexible targeting and stringent CARF ribonuclease activation, *Nat. Commun.*, **12**, 5033.
  45. McMahon, S. A., Zhu, W., Graham, S., Rambo, R., White, M. F., and Gloster, T. M. (2020) Structure and mechanism of a type III CRISPR defence DNA nuclease activated by cyclic oligoadenylate, *Nat. Commun.*, **11**, 500.
  46. Makarova, K. S., Karamycheva, S., Shah, S. A., Vestergaard, G., Garrett, R. A., and Koonin, E. V. (2019) Predicted highly derived class 1 CRISPR-Cas system in Haloarchaea containing diverged Cas5 and Cas7 homologs but no CRISPR array, *FEMS Microbiol. Lett.*, **366**, fnz079, doi: 10.1093/femsle/fnz079.
  47. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
  48. You, L., Ma, J., Wang, J., Artamonova, D., Wang, M., et al. (2019) Structure studies of the CRISPR-Csm complex reveal mechanism of co-transcriptional interference, *Cell*, **176**, 239-253.e16.
  49. Mirdita, M., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2021) ColabFold – Making protein folding accessible to all, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.08.15.456425.
  50. Rostøl, J. T., Xie, W., Kuryavii, V., Maguin, P., Kao, K., et al. (2021) The Card1 nuclease provides defence during type III CRISPR immunity, *Nature*, **590**, 624-629.
  51. Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C., and Brouns, S. J. J. (2017) CRISPR-Cas: adapting to change, *Science*, **356**, eaal5056, doi: 10.1126/science.aal5056.
  52. Levy, A., Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., et al. (2015) CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA, *Nature*, **520**, 505-510.
  53. Modell, J. W., Jiang, W., and Marraffini, L. A. (2017) CRISPR-Cas systems exploit viral DNA injection to establish and maintain adaptive immunity, *Nature*, **544**, 101-104.
  54. Shiriaeva, A. A., Savitskaya, E., Datsenko, K. A., Vvedenskaya, I. O., Fedorova, I., et al. (2019) Detection of spacer precursors formed *in vivo* during primed CRISPR adaptation, *Nat. Commun.*, **10**, 4603.
  55. Toro, N., Martínez-Abarca, F., Mestre, M. R., and González-Delgado, A. (2019) Multiple origins of reverse transcriptases linked to CRISPR-Cas systems, *RNA Biol.*, **16**, 1486-1493.
  56. Silas, S., Makarova, K. S., Shmakov, S., Páez-Espino, D., Mohr, G., et al. (2017) On the origin of reverse transcriptase-using CRISPR-Cas systems and their hyperdiverse, enigmatic spacer repertoires, *MBio*, **8**, e00897-17.
  57. Silas, S., Mohr, G., Sidote, D. J., Markham, L. M., Sanchez-Amat, A., et al. (2016) Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein, *Science*, **351**, aad4234.
  58. González-Delgado, A., Mestre, M. R., Martínez-Abarca, F., and Toro, N. (2019) Spacer acquisition from

- RNA mediated by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein associated with a type III-D CRISPR-Cas system in *Vibrio vulnificus*, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 10202-10211.
59. Wang, J. Y., Hoel, C. M., Al-Shayeb, B., Banfield, J. F., Brohawn, S. G., and Doudna, J. A. (2021) Structural coordination between active sites of a CRISPR reverse transcriptase-integrase complex, *Nat. Commun.*, **12**, 2571.
  60. Gleditsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., et al. (2019) PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures, *RNA Biol.*, **16**, 504-517.
  61. Xiao, Y., Luo, M., Hayes, R. P., Kim, J., Ng, S., et al. (2017) Structure basis for directional R-loop formation and substrate handover mechanisms in type I CRISPR-Cas system, *Cell*, **170**, 48-60.e11.
  62. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., and Doudna, J. A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9, *Nature*, **507**, 62-67.
  63. Singh, D., Mallon, J., Poddar, A., Wang, Y., Tippiana, R., et al. (2018) Real-time observation of DNA target interrogation and product release by the RNA-guided endonuclease CRISPR Cpf1 (Cas12a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 5444-5449.
  64. Marraffini, L. A., and Sontheimer, E. J. (2010) Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity, *Nature*, **463**, 568-571.
  65. Tamulaitis, G., Kazlauskienė, M., Manakova, E., Venclovas, Č., Nwokeji, A. O., et al. (2014) Programmable RNA shredding by the type III-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus thermophilus*, *Mol. Cell*, **56**, 506-517.
  66. Liu, L., Li, X., Ma, J., Li, Z., You, L., et al. (2017) The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a, *Cell*, **170**, 714-726.e10.
  67. Meeske, A. J., and Marraffini, L. A. (2018) RNA guide complementarity prevents self-targeting in Type VI CRISPR systems, *Mol. Cell*, **71**, 791-801.e3.
  68. Koonin, E. V., and Makarova, K. S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **374**, 20180087.
  69. Krupovic, M., Makarova, K. S., Forterre, P., Prangishvili, D., and Koonin, E. V. (2014) Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity, *BMC Biol.*, **12**, 36.
  70. Béguin, P., Charpin, N., Koonin, E. V., Forterre, P., and Krupovic, M. (2016) Casposon integration shows strong target site preference and recapitulates protospacer integration by CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 10367-10376.
  71. Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action, *Biol. Direct*, **1**, 7.
  72. Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., and Doudna, J. A. (2014) Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 528-534.
  73. Jackson, R. N., Golden, S. M., van Erp, P. B. G., Carter, J., Westra, E. R., et al. (2014) Structural biology. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*, *Science*, **345**, 1473-1479.
  74. Taylor, D. W., Zhu, Y., Staals, R. H. J., Kornfeld, J. E., Shinkai, A., et al. (2015) Structural biology. Structures of the CRISPR-Cmr complex reveal mode of RNA target positioning, *Science*, **348**, 581-585.
  75. Charpentier, E., Richter, H., van der Oost, J., and White, M. F. (2015) Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity, *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 428-441.
  76. Özcan, A., Pausch, P., Linden, A., Wulf, A., Schühle, K., et al. (2019) Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*, *Nat. Microbiol.*, **4**, 89-96.
  77. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2013) The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1392-1400.
  78. Burroughs, A. M., Zhang, D., Schäffer, D. E., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2015) Comparative genomic analyses reveal a vast, novel network of nucleotide-centric systems in biological conflicts, immunity and signaling, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10633-10654.
  79. Zhou, Y., Bravo, J. P. K., Taylor, H. N., Steens, J. A., Jackson, R. N., et al. (2021) Structure of a type IV CRISPR-Cas ribonucleoprotein complex, *iScience*, **24**, 102201.
  80. Swarts, D. C., Jore, M. M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J. H., et al. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute, *Nature*, **507**, 258-261.
  81. Kuzmenko, A., Oguienko, A., Esysunina, D., Yudin, D., Petrova, M., et al. (2020) DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease, *Nature*, **587**, 632-637.
  82. Krupovic, M., Béguin, P., and Koonin, E. V. (2017) Casposons: mobile genetic elements that gave rise to the CRISPR-Cas adaptation machinery, *Curr. Opin. Microbiol.*, **38**, 36-43.
  83. Zhou, Y., Bravo, J. P. K., Taylor, H. N., Steens, J., Jackson, R. N., et al. (2020) Structure of a type IV CRISPR-Cas effector complex, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.31.231399.
  84. Hopfner, K.-P., and Hornung, V. (2020) Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 501-521.
  85. Millman, A., Melamed, S., Amitai, G., and Sorek, R. (2020) Diversity and classification of cyclic-oligonucleotide-based anti-phage signalling systems, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1608-1615.
  86. Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kacen, A., et al. (2019) Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection, *Nature*, **574**, 691-695.
  87. Lowey, B., Whiteley, A. T., Keszei, A. F. A., Morehouse, B. R., Mathews, I. T., et al. (2020) CBASS immunity uses CARF-related effectors to sense 3'-5'- and 2'-5'-linked cyclic oligonucleotide signals and protect bacteria from phage infection, *Cell*, **182**, 38-49.e17.
  88. Ye, Q., Lau, R. K., Mathews, I. T., Birkholz, E. A., Watrous, J. D., et al. (2020) HORMA domain proteins and a Trip13-like ATPase regulate bacterial cGAS-like enzymes to mediate bacteriophage immunity, *Mol. Cell*, **77**, 709-722.e7.
  89. Lau, R. K., Ye, Q., Birkholz, E. A., Berg, K. R., Patel, L., et al. (2020) Structure and mechanism of a cyclic trinucleotide-activated bacterial endonuclease mediating bacteriophage immunity, *Mol. Cell*, **77**, 723-733.e6.
  90. Malone, L. M., Warring, S. L., Jackson, S. A., Warnecke, C., Gardner, P. P., et al. (2020) A jumbo phage that forms a nucleus-like structure evades CRISPR-Cas DNA targeting but is vulnerable to type III RNA-based immunity, *Nat. Microbiol.*, **5**, 48-55.

## TYPE III CRISPR-Cas SYSTEMS: THE DISSECTION OF THE MOST COMPLEX PROKARYOTIC IMMUNE SYSTEM

### Review

**M. V. Kolesnik<sup>1\*</sup>, I. Fedorova<sup>2,3</sup>, K. A. Karneyeva<sup>1</sup>,  
D. N. Artamonova<sup>1</sup>, and K. V. Severinov<sup>1,3,4\*</sup>**

<sup>1</sup> *Center of Life Science, Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia;  
e-mail: matveykolesnik@gmail.com; severik@waksman.rutgers.edu*

<sup>2</sup> *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251 St. Petersburg, Russia*

<sup>3</sup> *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,  
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA*

The emergence and persistence of selfish genetic elements is an intrinsic feature of all living systems. Cellular organisms have evolved a plethora of elaborate defense systems that limit the spread of such genetic parasites. CRISPR-Cas are RNA-guided defense systems used by prokaryotes to recognize and destroy foreign nucleic acids. These systems acquire and store fragments of foreign nucleic acids and utilize the stored sequences as guides to recognize and destroy genetic invaders. CRISPR-Cas systems have been extensively studied, as some of them are used in various genome editing technologies. Although Type III CRISPR-Cas systems are among the most common CRISPR-Cas systems, they are also some of the least investigated ones, mostly due to the complexity of their action compared to other CRISPR-Cas system types. Type III effector complexes specifically recognize and cleave RNA molecules. The recognition of the target RNA activates the effector large subunit – the so-called CRISPR polymerase – which cleaves DNA and produces small cyclic oligonucleotides that act as signaling molecules to activate auxiliary effectors, notably non-specific RNases. In this review, we provide a historical overview of the sometimes meandering pathway of the Type III CRISPR research. We also review the current data on the structures and activities of Type III CRISPR-Cas systems components, their biological roles, and evolutionary history. Finally, using structural modeling with AlphaFold2, we show that the archaeal HRAMP signature protein, which heretofore has had no assigned function, is a degenerate relative of Type III CRISPR-Cas signature protein Cas10, suggesting that HRAMP systems have descended from Type III CRISPR-Cas systems or their ancestors.

**Keywords:** CRISPR-Cas Type III, prokaryotic immunity, RNA-guided defense, cyclic oligonucleotides, CRISPR evolution, HRAMP