

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 3, 2021

Рекомбинантный S-белок SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> способен связывать гликаны семейства лактозамина <i>А.Б. Рыжиков, Г.С. Онхонова, И.Р. Иматдинов, Е.В. Гаврилова, Р.А. Максюттов, Е.А. Гордеева, Г.В. Пазынина, И.М. Рыжов, Н.В. Шилова, Н.В. Бовин</i>	291
Структура и механизмы экспрессии больших (+)РНК-геномов вирусов высших эукариот (мини-обзор) <i>А.А. Аграновский</i>	297
Повышение экспрессии белков NOX-2 и Nrf-2 способствует возникновению устойчивости клеток карциномы толстой кишки человека (НСТ-116) к действию 5-фторурацила <i>Б.Н. Вагхела, Ф.У. Вайдия, Ч. Патхак</i>	308
Роль естественных процессов старения в возникновении и патогенезе болезней, связанных с аномальным накоплением белковых агрегатов (обзор) <i>Н.С. Ильинский, С.В. Нестеров, Е.И. Шестопёрова, А.В. Фонин, В.Н. Уверский, В.И. Горделий</i>	324
Молекулярные и клеточные механизмы патогенеза респираторно-синцитиальной вирусной инфекции. Новые данные на экспериментальных моделях (обзор) <i>И.П. Шиловский, К.В. Юмашев, А.А. Никольский, Л.И. Вишнякова, М.Р. Хаитов</i>	341
Мутации в ДНК-метилтрансферазе DNMT3A при остром миелоидном лейкозе (обзор) <i>Д.А. Храброва, М.Г. Якубовская, Е.С. Громова</i>	360
Микробный арсенал противовирусной защиты. Глава I (обзор) <i>А.Б. Исаев, О.С. Мушарова, К.В. Северинов</i>	374
Клеточный ответ на стресс в панорамной протеомике: контроль ложноположительных результатов <i>И.Т. Габдрахманов, М.В. Горшков, И.А. Тарасова</i>	395
Прямое действие синтетического аналога глюкагон-подобного пептида 1-го типа, лираглутида, на зрелые адипоциты реализуется через аденилатциклаза-зависимое усиление инсулиновой чувствительности <i>Е.Д. Мамонтова, С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, Е.Л. Соркина, И.А. Скляник, Е.О. Кокшарова, М.Ю. Меньшиков, М.В. Шестакова, Е.В. Парфёнова</i>	409
Характеристика каталитических свойств флавоцитохром <i>c</i> сульфиддегидрогеназы из галоалкалофильной бактерии <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> <i>Т.В. Тихонова, А.В. Лильина, Е.М. Осипов, Н.С. Шипков, Н.И. Дергоусова, О.Г. Куликова, В.О. Попов</i>	422
Влияние динамических и статических нагрузок на концентрацию миокинов в плазме и на содержание натрия и калия в скелетных мышцах мышей <i>Т.А. Кироненко, К.Г. Милованова, А.Н. Захарова, С.В. Сидоренко, Е.А. Климанова, Е.Ю. Дьякова, А.А. Орлова, Е.С. Негоденко, Ю.Г. Калинин, С.Н. Орлов, Л.В. Капилевич</i>	431
Митохондриальный антиоксидант SKQ1 повышает эффективность гипотермической консервации роговицы <i>Г.С. Батурина, Л.Е. Каткова, И.Г. Пальчикова, Н.Г. Колосова, Е.И. Соленов, И.А. Искаков</i>	443
ГИПОТЕЗА	
Свободные S1-субъединицы белка шипов вируса SARS-CoV-2 могут действовать в качестве фактора патогенеза COVID-19 <i>А.В. Летаров, В.В. Бабенко, Е.Е. Куликов</i>	451

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 3, 2021

Recombinant S Protein of SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> Is Capable of Binding Glycans of the Lactosamine Family <i>A. B. Ryzhikov, G. S. Onkhonova, I. R. Imatdinov, E. V. Gavrilova, R. A. Maksyutov, E. A. Gordeeva, G. V. Pazykina, I. M. Ryzhov, N. V. Shilova, and N. V. Bovin</i>	291
Structure and Expression of Large Positive-Sense RNA Genomes of Eukaryotic Viruses (Mini-Review) <i>A. A. Agranovsky</i>	297
Upregulation of NOX-2 and Nrf-2 Promotes 5-Fluorouracil-Resistance of Human Colon Carcinoma (HCT-116) Cells <i>Bh. N. Waghela, F. U. Vaidya, and Ch. Pathak</i>	308
On the Role of Normal Aging Processes in the Emergence and Pathogenesis of the Diseases Associated with the Abnormal Accumulation of Protein Aggregates (Review) <i>N. S. Ilyinsky, S. V. Nesterov, E. I. Shestoperova, A. V. Fonin, V. N. Uversky, and V. I. Gordeliy</i>	324
Molecular and Cellular Mechanisms of Respiratory Syncytial Viral Infection. Understanding Human Pathology by Murine Models (Review) <i>I. P. Shilovskiy, K. V. Yumashev, A. A. Nikolsky, L. I. Vishnyakova, and M. R. Khaitov</i>	341
AML-Associated Mutations in DNMT3A DNA Methyltransferase (Review) <i>D. A. Khrabrova, M. G. Yakubovskaya, and E. S. Gromova</i>	360
Microbial Arsenal of Antiviral Defenses. Part I (Review) <i>A. B. Isaev, O. S. Musharova, and K. V. Severinov</i>	374
Proteomics of Cellular Response to Stress: Taking Control of False Positive Results <i>I. T. Gabdrakhmanov, M. V. Gorshkov, and I. A. Tarasova</i>	395
Direct Action of Glucagon-Like Peptide Type 1 Synthetic Analogue Liraglutide Realizes through Adenylate-Cyclase-Dependent Enhancing of Insulin Sensitivity <i>E. D. Mamontova, S. S. Michurina, I. S. Stafeev, E. L. Sorkina, I. A. Sklyanik, E. O. Koksharova, M. Y. Menshikov, M. V. Shestakova, and Ye. V. Parfyonova</i>	409
Catalytic Properties of Flavocytochrome <i>c</i> Sulfide Dehydrogenase from Haloalkaliphilic Bacterium <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> <i>T. V. Tikhonova, A. V. Lilina, E. M. Osipov, N. S. Shipkov, N. I. Dergousova, O. G. Kulikova, and V. O. Popov</i>	422
Influence of Dynamic and Static Loads on the Concentration of Myokines in Plasma and on the Content of Sodium and Potassium in the Skeletal Muscles of Mice <i>T. A. Kironenko, K. G. Milovanova, A. N. Zakharova, S. V. Sidorenko, E. A. Klimanova, E. Yu. Dyakova, A. A. Orlova, E. S. Negodenko, Yu. G. Kalinnikova, [S. N. Orlov], and L. V. Kapilevich</i>	431
Mitochondrial Antioxidant SkQ1 Improves Hypothermic Preservation of Cornea <i>G. S. Baturina, L. E. Katkova, I. G. Palchikova, N. G. Kolosova, E. I. Solenov, and I. A. Iskakov</i>	443
HYPOTHESIS	
Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Act as a Factor of COVID-19 Pathogenesis <i>A. V. Letarov, V. V. Babenko, and E. E. Kulikov</i>	451

УДК 571.27

РЕКОМБИНАНТНЫЙ S-БЕЛОК SARS-CoV-2 *in vitro* СПОСОБЕН СВЯЗЫВАТЬ ГЛИКАНЫ СЕМЕЙСТВА ЛАКТОЗАМИНА

© 2021 А.Б. Рыжиков¹, Г.С. Онхонова¹, И.Р. Иматдинов¹, Е.В. Гаврилова¹,
Р.А. Максюттов¹, Е.А. Гордеева², Г.В. Пазынина²,
И.М. Рыжов², Н.В. Шилова^{2,3}, Н.В. Бовин^{2*}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР» Роспотребнадзора,
630559 р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: professorbovin@yandex.ru

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени
академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.11.2020

После доработки 11.11.2020

Принята к публикации 11.11.2020

Для многих вирусов, кроме основной, находят дополнительную клеточную мишень, способствующую адгезии вируса к клетке; часто эту роль играют гликаны. Для SARS-CoV-2 основным рецептором является пептидный мотив белка ACE2. Мы изучили взаимодействие рекомбинантного белка S SARS-CoV-2 с широким набором гликоконъюгатов, который включал различные сиалилированные, сульфатированные и другие гликаны, и обнаружили, что этот белок способен связывать некоторые (но не все) гликаны семейства лактозаминов. Так как действие нейраминидазы вируса гриппа приводит к демаскировке лактозаминовых цепей, мы предполагаем, что параллельное инфицирование вирусом гриппа усилит адгезию SARS-CoV-2 к респираторному эпителию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, S-гликопротеин, гликоконъюгаты, N-ацетилглюкозамин.

DOI: 10.31857/S0320972521030015

ВВЕДЕНИЕ

Ключевая роль в адгезии коронавируса (CoV) к клетке-хозяину приписывается вирусному S-белку, который представляет собой гомомер, каждый из мономеров которого состоит из двух субъединиц, S1 и S2. Субъединица S2 заякорена в вирусной мембране и отвечает за слияние с клеткой-хозяином [1, 2]. Эктодомен S1 состоит из четырех субдоменов (S1A–S1D), каждый из которых может играть рецептор-связывающую роль, но до сих пор неясно, действуют ли они совместно или по отдельности [3]. В вирусе MERS-CoV субдомен S1B отвечает за взаимодействие с дипептидилпептидазой-4 и имеет решающее значение для проникновения в хозяйскую клетку, в то

время как лектиноподобный субдомен S1A связывает O-ацетилированный сиалогликан [4, 5]. В случае SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 субдомен S1B распознает ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [6]; в литературе не встречается информации о специфичности других субдоменов, хотя ACE2 не является единственной возможной мишенью для белка S из SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2; в частности, это гликопротеин CD147 [7, 8]. S-Белок других коронавирусов человека, таких как HKU1 и OC43, а также бычий BCoV имеют лектиноподобный домен S1A, который связывает 9-O-ацетилированную сиаловую кислоту (Sia); это взаимодействие не является высокоаффинным, но тем не менее способствует процессу проникновения вируса ближе к его основной мишени [9]. Что касается сиало-связывающей активности S-белка из SARS-CoV-2, данные противоречивы: в работе Hao et al. [10] приводится отрицательный вывод, однако есть и другие исследования, указывающие на возможность связывания с ганглиозидами [11]. Следует отметить, что все поверхностные белки SARS-CoV-2 сиалилированы, особенно S-белок с его 22 сайтами гликозилиро-

Принятые сокращения: ТФА – твердофазный метод анализа; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; biot – биотин; CoV – коронавирус; Gluc – гликан; LN – Galβ1-4GlcNAcβ; PAA – полиакриламид; PBS – фосфатный буферный раствор; PBS-T – PBS, содержащий 0,1% Tween 20; S – спайковый белок; Sia – сиаловая кислота.

* Адресат для корреспонденции.

вания. Поскольку вирус не должен связываться с самим собой, очевидно, что его гликан-узнающий белок не будет связывать такие типичные терминации углеводных цепей человека с сиаловой кислотой, как Neu5Ac α 2-3Gal и Neu5Ac α 2-6Gal; хотя нельзя исключить взаимодействия с O-ацетилированными сиалозидами, редкими для эпителиальной клетки хозяина, и это действительно имеет место для S-белка MERS-CoV. Иными словами, если SARS-CoV-2 и обладает сиало-связывающей способностью, то форма распознаваемой Sia должна отличаться от обычных сиало-мотивов Neu5Ac α 2-3Gal и Neu5Ac α 2-6Gal.

Было показано [12], что низкомолекулярный гепарин обладает значительным противовоспалительным действием при лечении пациентов с COVID-19 за счет значительного снижения провоспалительного цитокина IL-6; кроме того, считается, что гепарин может напрямую взаимодействовать с SARS-CoV-2. Гликозаминогликаны (ГАГ) могут действовать как факторы адгезии для аденовирусов, вирусов герпеса, папилломавируса, цитомегаловируса и других, и эта адгезия эффективно ингибируется растворимой формой ГАГ [13]. Коронавирусы также не являются исключением – NL63 и SARS-CoV-1 (в форме псевдовirusа) используют ГАГ для адгезии к клетке-хозяина вместе с рецептором ACE2 [14]. Примерная форма S-белка пандемического SARS-CoV-2 связывается с полноразмерным гепарином с поразительной аффинностью (40 пМ), что на несколько порядков лучше, чем для S-белка MERS-CoV [15], присутствие 2-O- и 6-O-сульфатов, по-видимому, важно для связывания [16]. Принимая во внимание все вышеперечисленное, мы исследовали гликановую специфичность рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2, ожидая увидеть связывание с дополнительными углеводными рецепторами – сульфатированными или необычными (см. выше) сиалилированными гликанами млекопитающих, но обнаружили высокоаффинное взаимодействие в первую очередь с гликанами лактозаминового типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гликоконъюгаты Glyc-РАА-biot (где Glyc – это гликан, РАА – полиакриламид, biot – биотин с C5-спейсером) с молекулярной массой 20 кДа, содержащие 20 мол% гликана и 5 мол% биотина, получены от «GlycoNZ», Новая Зеландия.

Гомотример S-белка. Рекомбинантный тримерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2 был

получен с использованием исходного экспрессирующего плазмидного вектора SBW4G_S-FdT4 («Вектор», Россия). Химерный ген, кодирующий эктодомен S-гликопротеина и домен тримерного бета-пропеллера фибритина бактериофага T4 с C-концевой последовательностью 8-гистидиновой метки (His₈-tag), контролировали промотором СAG. Временная экспрессия достигалась трансфекцией трансплантированных клеток НЕК293 (Институт цитологии РАН, Россия) рекомбинантной плазмидой SBW4G_S-FdT4. Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью аффинной хроматографии на приборе Ni-NTASuperFlow («Qiagen», Германия). Чистота и целостность всех очищенных рекомбинантных белков подтверждена SDS-PAGE; молекулярная масса одной субъединицы составляет 139 кДа, аминокислотная последовательность приведена на рисунке в Приложении.

Скрининговый твердофазный анализ (ТФА). S-Белок (5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS)) вносили в лунки планшета Nunc MaxiSorp («Thermo Fisher», США) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, после чего раствор удаляли, а лунки высушивали. Затем планшет промывали PBS, содержащим 0,1% (w/v) Tween 20 (PBS-T, «Merck», США). Гликоконъюгаты Glyc-РАА-biot двукратно, начиная с 10 мкг/мл, разбавляли раствором для разведения сыворотки («Эпитек», Россия). Планшет инкубировали с полученными растворами 90 мин на шейкере («Elmi», Латвия) при 37 °С, промывали и прибавляли по 100 мкл конъюгата пероксидазы хрена («Эпитек», Россия) в разведении 1/20 в PBS-T, затем инкубировали на термошейкере при 7 °С. Планшет промывали PBS-T и прибавляли по 100 мкл раствора тетраметилбензидина («Thermo Fisher», США), после чего инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре; цветную реакцию останавливали 5%-ной серной кислотой. С помощью микропланшетного ридера Bio-Rad Model 680 («Bio-Rad», США) измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

Измерение констант диссоциации. Растворы конъюгатов 11 гликанов, продемонстрировавших наивысшую связывающую активность в скрининговом ТФА, двукратно, начиная с 10 мкг/мл, разбавляли раствором для разведения сыворотки («Эпитек», Россия) и вносили в лунки 96-луночного стрипованного планшета Nunc MaxiSorp («Thermo Fisher», США), покрытого S-белком (см. выше). Стрипы инкубировали на шейкере при 37 °С; каждые 10 мин один из стрипов промывали раствором PBS-T и помещали в холодильник (4 °С). Через 100 мин все

стрипы обрабатывали, как описано выше, и сравнивали данные стрипов, различающихся временем инкубации. Концентрация комплекса гликан/S-белок описывается уравнениями взаимодействия лиганд–рецептор (уравнения 1–4):

$$[LR] = A(1 - e^{-kt}), \quad (1)$$

$$A = \frac{[R]_0[L]_0}{K_d + [R]_0}, \quad (2)$$

$$k = k_+[R]_0 + k_-, \quad (3)$$

$$K_d = \frac{k_-}{k_+}, \quad (4)$$

где $[LR]$ – концентрация комплекса, $[R]_0$ и $[L]_0$ – начальные концентрации гликана и S-белка соответственно, k_+ и k_- – константы скорости. Показатель k рассчитывали путем аппроксимации экспериментальной зависимости концентрации комплекса гликан/S-белок от времени функцией (1) с использованием пакета программ OriginProc («OriginLab Corporation», США). Поскольку k определяли при нескольких концентрациях конъюгата, при построении графика зависимости рассчитанных параметров k от концентрации добавленных гликоконъюгатов было получено линейное уравнение (3). K_d рассчитывали согласно уравнению (4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя наша группа широко использует гликановый эррей (printed glycan array, PGA) [17] для изучения гликан-связывающих (включая вирусные) белков, в случае профилирования специфичности S-белка мы использовали ТФА, где S-белок нанесен на полистироловый планшет, а гликополимеры типа Gluc-РАА-biot связываются с иммобилизованным на планшете белком. Хотя эта методология более хлопотная, и предполагались проблемы с вкладом неспецифического компонента из-за наличия избыточных остатков биотина в Gluc-РАА-biot (в среднем их количество составляет ~10 на одну цепь РАА [18]), у этого «обратного» метода ожидалось определенное преимущество – мы рассчитывали, что в этом анализе сравнение значений поглощения связывания S-белка с различными гликанами должно дать нам надежные относительные значения аффинности, в то время как PGA [19], где иммобилизованы лиганды, не гарантирует равную степень иммобилизации лиганда на твердой фазе. Всего с помощью ТФА

было исследовано взаимодействие со 155 гликоконъюгатами, среди которых типичные для клеток человека сиалогликаны, широкий спектр сульфатированных гликанов, а также множество олигосахаридов N-ацетилактозаминового типа, гликаны, представляющие собой антигены группы крови АВН, и многие другие. Максимальное значение поглощения в этой версии ТФА, которому можно доверять, составляет немногим более 3, поэтому мы отнесли к сильным сигналам значения, которые попадают в диапазон 2,0–3,2; значения <1,0 мы расценивали как отсутствие специфического связывания. Несмотря на то что условия анализа были намеренно «настроены» на усиление самых низких сигналов, он не выявил какого-либо значительного взаимодействия S-белка ни с сульфатированными, ни с обычными сиалилированными гликанами, т.е. имеющими в своем составе терминации Neu5Ac α 2-3Gal, Neu5Ac α 2-6Gal или Neu5Ac α 2-6GalNAc, а также структурные мотивы 9-NAc-Neu5Ac α (9-NAc-производные взяты как устойчивые миметики соответствующих O-Ac сиалозидов). Единственным сиалолигандом с обнаруженным высокоаффинным связыванием был дисахарид Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α (№ 11, таблица), хотя тетрасахарид ганглиозида GD2 (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β) не обнаруживал связывания в нашем анализе, также как и трисахарид Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α . Связывание дисахарида Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α , по-видимому, в основном обусловлено двумя карбоксильными группами (т.е. кулоновским взаимодействием, это согласуется с недавно опубликованной статьей о связывании вируса с кластерами моносахарида Neu5Ac [20]) двух остатков Neu5Ac, случайно оказавшихся на таком расстоянии друг от друга, которое благоприятно для взаимодействия с лектиноподобным участком; следует отметить, что объемный заместитель R в Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -R (в том числе и в ганглиозидах, где R – внутреннее углеводное ядро) отменяет его. В таблице показаны все гликаны, обладающие высокой связывающей активностью (их значение поглощения было больше 2,0).

Примечательно, что среди 10 топовых гликанов 8 (в таблице показаны серым цветом) являются типичными лигандами для галектинов человека – олиголактозамины, гликановая часть гликофинголипида асиало-GM1, а также тетрасахариды группы крови А (тип 4) и В (тип 4). Если мы посмотрим на «гликаны второго уровня», показавшие величину поглощения в диапазоне 2,0–2,6, среди них четыре относятся к производным лактозамина, а два – к моносахариду галактозе и ее сульфату по положению 3. То есть тенденция S-белка связывать бета-галактозиды

Структура гликанов, продемонстрировавших высокий уровень связывания с S-белком в ТФА (в его скрининговом варианте)

№	Структура и [тривиальное или короткое название] гликанов	Поглощение, ТФА
1	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β [группоспецифический антиген А тип 4]	3,21
2	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α [LN6TF]	3,16
3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β [LN ₂]	3,13
4	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β [асиало GM1]	3,11
5	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β [LN6'LN]	2,99
6	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β [группоспецифический антиген В тип 4]	2,90
7	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β [A _{III} с гидрофобным спейсером]	2,86
8	GlcNAc α 1-3GalNAc β	2,82
9	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β [антиген Galili]	2,76
10	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	2,64
11	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α [дисиадозид]	2,60
12	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β [антиген Le ^x]	2,56
13	GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β	2,55
14	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β [LN ₃ , или антиген группы крови i]	2,42
15	GlcN(Gc) β	2,20
16	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β [антиген группы крови I]	2,14
17	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β	2,08
18	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	2,05
19	3-O-Su-Gal β	2,03
20	β -Gal	2,03
21	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β [антиген Tk]	2,01

Примечание. Серым цветом выделены типичные лиганды галектинов. Используемые сокращения: LN – Gal β 1-4GlcNAc.

очевидна. Интересно, что незамещенный дисахарид Gal β 1-4GlcNAc β (т.е. мономерный LN) показал низкое связывание по сравнению с топовыми лактозаминами из таблицы, что также характерно для галектинов человека [21].

Несомненное сходство паттернов распознавания S-белка SARS-CoV-2 и галектинов можно объяснить структурными особенностями S-белка, а именно, тем что домен S1A различных CoV (MERS-CoV, HCoV-OC43, BCoV и TGEV) имеет специфический галектиновый фолд [9, 22]. Однако до сих пор связывание с содержащими галактозу гликанами – галектиновыми лигандами – для них не было описано. Предполагается, что галектиновый фолд в S-белке эволюционно заимствован у клетки-хозяина в его неполноразмерной форме и, следовательно, он не функционирует как лектин. То есть этот домен не способен связывать структурные мотивы, содержащие β Gal, однако в ходе дальнейшей эволюции у некоторых вирусов он настроился на распознавание других углеводных мотивов [23, 24].

Не все топовые гликаны (таблица) структурно похожи на галектиновые лиганды. О дисиадозиде мы говорили выше. Что касается трисахарида Le^x (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β), известно, что он не связывается ни с одним из галектинов человека, но в то же время N-ацетиллактозамин является его составной частью; поэтому узнавание не совсем обычного лиганда не совсем обычным галектином не кажется нам удивительным. Про трисахарид группы крови А (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β) также известно, что он не является галектиновым лигандом. Мы объясняем факт его попадания в топовые лиганды следующим образом: этот гликан отличается от других лигандов использованного набора гликопроб своей гидрофобностью, а именно, имеет спейсер – O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₅NH-; тот же трисахарид А, лишенный этой гидрофобности, оказался плохим лигандом для S-белка. Мы считаем, что наблюдаемое связывание трисахарида А на самом деле является результатом успешной комбинации двух «слагаемых» – неспецифического (гидрофобного) и специфического (GalNAc α),

последнее является относительно слабым, и поэтому недостаточным для проявления сродства к S-белку без «помощи» необычного спейсера. Обнаруженная способность распознавать гликаны с концевым фрагментом глюкозамина, например GlcNAc α 1-3GalNAc α , а также другие гликаны, не принадлежащие к семейству лактозаминов (см. выше), на первый взгляд не укладывается в гипотезу галектино-подобного сайта связывания S-белка. Тем не менее нам известны примеры, когда замена одной или двух аминокислот в лектине не просто отменяет связывание углеводов, но приводит к способности распознавать другой гликан [25]. В нашем случае прямая разница в аминокислотной последовательности очень велика (данные не показаны) — речь идет только о сходстве фолдов. Таким образом, различие между S-белком и галектином, распознающим гликаны, само по себе не удивительно; но удивительным является «возвращение» галектинового фолда в S-белке последнего коронавируса к способности связывать типичные галектиновые лиганды, утраченной другими коронавирусами.

Мы провели дополнительное исследование с помощью такого же ТФА, но в кинетическом режиме (см. Материалы и методы), чтобы оценить аффинность взаимодействия рекомбинантного S-белка по отношению к 11 топовым гликоконъюгатам. Наибольшее сродство было обнаружено для дисиалозида ($K_d = 10$ нМ, все значения относятся к гликану, а не к его полимерному конъюгату) и Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α (LN6TF) с $K_d = 20$ нМ. Значения K_d для ACE2 в литературе варьируют от 1,2 нМ [2] до 95 нМ [26]. Конечно, было бы некорректно напрямую сравнивать эти данные, полученные в совершенно разных экспериментальных системах; тем не менее измеренные значения K_d предполагают возможность вклада углеводной рецепции *in vivo*. Конечно, особенно важно знать, какие гликаны являются реальными или

потенциальными/дополнительными мишенями вируса на респираторном эпителии. На основании полученных данных можно предположить, что это N-ацетиллактозаминоновый гликан в составе O-цепи гликопротеина, поскольку тетрасахарид, показавший одно из лучших значений K_d , — это LN6TF, тогда как типичные для N-цепей олиголактозаминоновые гликаны продемонстрировали меньшее сродство.

Большинство лактозаминоновых мотивов на клетках легочного эпителия маскируются присоединенной к ним сиаловой кислотой; поэтому маловероятно, что у здорового человека дополнительное сродство вируса (к лактозаминам) внесет значительный вклад в его первичную адгезию. Однако под действием нейраминидазы, которая присутствует в составе многих патогенов (в первую очередь вируса гриппа), остатки Sia элиминируются, тем самым обнажая остатки лактозаминов. Это позволяет нам выдвинуть гипотезу об усилении адгезии (и, следовательно, повышенной вирулентности) SARS-CoV-2 при параллельном инфицировании патогенами, имеющими мощную нейраминидазу.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60335).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 3, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tortorici, M. A., Walls, A. C., Lang, Y., Wang, C., Li, Z., et al. (2019) Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 481-489, doi: 10.1038/s41594-019-0233-y.
2. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Veesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 282-291, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
3. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, *Nat. Commun.*, **11**, 1-6, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
4. Li, W., Hulsmit, R. J. G., Widjaja, I., Raj, V. S., McBride, R., et al. (2017) Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8508-E8517, doi: 10.1073/pnas.1712592114.
5. Park, Y. J., Walls, A. C., Wang, Z., Sauer, M. M., Li, W., et al. (2019) Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1151-1157, doi: 10.1038/s41594-019-0334-7.
6. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., et al. (2020) Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV, *Nat. Commun.*, **11**, 1620, doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
7. Chen, Z., Mi, L., Xu, J., Yu, J., Wang, X., et al. (2005) Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by

- severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Infect. Dis.*, **191**, 755-760, doi: 10.1086/427811.
8. Wang, K., Chen, W., Zhou, Y.-S., Lian, J.-Q., Zhang, Z., et al. (2020) SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.14.988345.
 9. Qing, E., Hantak, M., Perlman, S., and Gallagher, T. (2020) Distinct roles for sialoside and protein receptors in coronavirus infection, *MBio*, **11**, e02764-e02819, doi: 10.1128/mBio.02764-19.
 10. Hao, W., Ma, B., Li, Z., Wang, X., Gao, X., et al. (2020) Binding of the SARS-CoV-2 spike protein to glycans, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.05.17.100537.
 11. Engin, A. B., Engin, E. D., and Engin, A. (2020) Dual function of sialic acid in gastrointestinal SARS-CoV-2 infection, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **79**, 103436, doi: 10.1016/j.etap.2020.103436.
 12. Shi, C., Wang, C., Wang, H., Yang, C., Cai, F., et al. (2020) Clinical observations of low molecular weight heparin in relieving inflammation in COVID-19 patients: a retrospective cohort study, *medRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.28.20046144.
 13. Ströh, L. J., and Stehle, T. (2014) Glycan engagement by viruses: receptor switches and specificity, *Annu. Rev. Virol.*, **1**, 285-306, doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085417.
 14. Milewska, A., Zarebski, M., Nowak, P., Stozek, K., Potempa, J., and Pyrc, K. (2014) Human Coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells, *J. Virol.*, **88**, 13221-13230, doi: 10.1128/JVI.02078-14.
 15. Kim, S. Y., Jin, W., Sood, A., Montgomery, D. W., Grant, O. C., et al. (2020) Glycosaminoglycan binding motif at S1/S2 proteolytic cleavage site on spike glycoprotein may facilitate novel coronavirus (SARS-CoV-2) host cell entry, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.14.041459.
 16. Mycroft-West, C., Su, D., Pagani, I., Rudd, T., Elli, S., et al. (2020) Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the surface protein (spike) S1 receptor binding domain with heparin, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.28.066761.
 17. Olivera-Ardid, S., Khasbiullina, N., Nokel, A., Formanovsky, A., Popova, I., et al. (2019) Printed glycan array: a sensitive technique for the analysis of the repertoire of circulating anti-carbohydrate antibodies in small animals, *J. Vis. Exp.*, **144**, 1-7, doi: 10.3791/57662.
 18. Bovin, N. V. (1998) Polyacrylamide-based glycoconjugates as tools in glycobiology, *Glycoconj. J.*, **15**, 431-446, doi: 10.1023/a:1006963717646.
 19. Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M. E., et al. (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17033-17038, doi: 10.1073/pnas.0407902101.
 20. Baker, A. N., Richards, S. J., Guy, C. S., Congdon, T. R., Hasan, M., et al. (2020) The SARS-COV-2 spike protein binds sialic acids and enables rapid detection in a lateral flow point of care diagnostic device, *ASC Central Science*, **6**, 2046-2052, doi: 10.1021/acscentsci.0c00855.
 21. Rapoport, E. M., Pochechueva, T. V., Kurmyshkina, O. V., Pazygina, G. V., Severov, V. V., et al. (2010) Solid-phase assays for study of carbohydrate specificity of galectins, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 310-319, doi: 10.1134/s0006297910030077.
 22. Li, F. (2015) Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies, *J. Virol.*, **89**, 1954-1964, doi: 10.1128/JVI.02615-14.
 23. Peng, G., Sun, D., Rajashankar, K. R., Qian, Z., Holmes, K. V., and Li, F. (2011) Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10696-10701, doi: 10.1073/pnas.1104306108.
 24. Peng, G., Xu, L., Lin, Y. L., Chen, L., Pasquarella, J. R., Holmes, K. V., and Li, F. (2012) Crystal structure of bovine coronavirus spike protein lectin domain, *J. Biol. Chem.*, **287**, 41931-41938, doi: 10.1074/jbc.M112.418210.
 25. Drickamer, K., and Taylor, M. E. (1993) Biology of animal lectins, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 237-264, doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.001321.
 26. Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., et al. (2020) Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2, *Cell*, **181**, 894-904.e9, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.

RECOMBINANT S PROTEIN OF SARS-CoV-2 *in vitro* IS CAPABLE OF BINDING GLYCANS OF THE LACTOSAMINE FAMILY

A. B. Ryzhikov¹, G. S. Onkhonova¹, I. R. Imatdinov¹, E. V. Gavrilova¹, R. A. Maksyutov¹, E. A. Gordeeva², G. V. Pazygina², I. M. Ryzhov², N. V. Shilova^{2,3}, and N. V. Bovin^{2*}

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Rospotrebnadzor, 630559 Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: professorbovin@yandex.ru

³ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997 Moscow, Russia

Many viruses, beside binding to their main cell target, interact with other molecules that promote virus adhesion to the cell; often, these additional targets are glycans. The main receptor for SARS-CoV-2 is a peptide motif in the ACE2 protein. We studied interaction of the recombinant SARS-CoV-2 spike (S) protein with an array of glycoconjugates, including various sialylated, sulfated, and other glycans, and found that the S protein binds some (but not all) glycans of the lactosamine family. We suggest that parallel influenza infection will promote SARS-CoV-2 adhesion to the respiratory epithelial cells due to the unmasking of lactosamine chains by the influenza virus neuraminidase.

Keywords: SARS-CoV-2, spike glycoprotein, glycoconjugates, lactosamine

УДК 577.216.35

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ ЭКСПРЕССИИ БОЛЬШИХ (+)РНК-ГЕНОМОВ ВИРУСОВ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

Мини-обзор

© 2021 А.А. Аграновский

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра вирусологии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: etdonas2@gmail.com

Поступила в редакцию 17.08.2020

После доработки 21.09.2020

Принята к публикации 29.09.2020

Быстрые темпы эволюции РНК-геномов, которые обусловлены высоким уровнем мутаций и рекомбинацией при копировании цепей РНК, позволяют вирусу изменять и приобретать последовательности для оптимальной адаптации. Размеры РНК-генома ограничены факторами, связанными с точностью РНК-полимераз и упаковкой. В ходе эволюции (+)РНК-геномы нидовирусов животных (артеривирусов, ронивирусов, коронавирусов) и кластеровирусов растений преодолели барьер в 12 тыс. нуклеотидов. Коронавирусы и кластеровирусы имеют общие свойства. Их РНК-геномы содержат 5'-концевые гены, экспрессируемые с помощью рибосомального сдвига рамки считывания и кодирующие домены папаин-подобной протеиназы, метилтрансферазы, мембраносвязывающих белков, хеликазы и РНК-полимеразы. Коронавирусы, в дополнение к этому, содержат домены экзонуклеазы с редактирующей активностью, гипотетической праймазы, нуклеотидилтрансферазы и эндонуклеазы. РНК-геном коронавирусов и кластеровирусов содержит на 3'-конце гены структурных и вспомогательных белков, для экспрессии которых используется набор котерминальных субгеномных РНК. В ходе эволюции вирионов представители обеих вирусных групп приобрели гибкие спирально-симметричные нуклеокапсиды, что позволило снять ограничения на размер инкапсидируемых молекул РНК. Филогенетические реконструкции домена РНК-полимеразы указывают лишь на отдаленное родство коронавирусов и кластеровирусов, и их общие свойства скорее всего возникли независимо при эволюции больших РНК-геномов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирусные РНК-геномы, нидовирусы, SARS-CoV, кластеровирусы, эволюция, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972521030027

ВВЕДЕНИЕ

Быстрые темпы эволюции вирусных РНК-геномов, обусловленные высоким уровнем мутаций и «перетасовкой генов» при репликации, приводят к изменению и приобретению генов, необходимых для адаптации вируса. Большин-

ство РНК-содержащих вирусов имеет компактные геномы размером 4–12 kb (1 kb – 1000 нуклеотидов) [1]. Размеры РНК-генома ограничиваются рядом факторов, в первую очередь связанных с точностью репликации РНК. Вирусные РНК-зависимые РНК-полимеразы вносят около 10^{-4} ошибок на копируемый нуклеотидный остаток, т.е. на несколько порядков больше, чем ДНК-полимеразы [2, 3]. Считается, что накопление неблагоприятных мутаций при копировании больших РНК-геномов превышает критический уровень, при котором возможно воспроизводство жизнеспособных вариантов вируса [4]. Кроме того, размеры РНК влияют на ее стабильность и ограничивают возможность упаковки в капсид определенного типа [5].

В ходе эволюции РНК-геномы нидовирусов животных (сем. Arteriviridae, Coronaviridae, Roniviridae и Mesoniviridae; порядок Nidovirales) и кластеровирусов растений (сем. Closteroviridae) преодолели барьер в 12 000 нуклеотидов (нт). Коронавирусы имеют самые крупные

Принятые сокращения: нт – нуклеотид; ОРТ – открытая рамка трансляции; сгРНК – субгеномные РНК; ЭР – эндоплазматический ретикулум; BYV – кластеровирус желтухи свеклы (beet yellows virus); СР и СРm – мажорный и минорный структурные белки; DMV – везикула, окруженная двухслойной мембраной (double membrane vesicle); HEL – РНК-хеликаза; kb – kilobase, 1000 нуклеотидов; L – лидерная последовательность РНК; MHV – коронавирус мышьяного гепатита; МР – (главная) сериновая протеиназа; Мtr – N7-гуанин-метилтрансфераза; MVC – мультивезикулярный комплекс; nsp – неструктурный белок; NU – нидовирусная уридилат-специфичная эндорибонуклеаза; POL – РНК-полимераза; pp – полипротеин; SARS-CoV – коронавирусы тяжелого острого респираторного синдрома; TRS – сигналы регуляции транскрипции нидовирусов (transcription regulatory signals).

неразделенные РНК-геномы среди всех (+)РНК-вирусов (до 41 kb у коронавируса планарий [6]). Размеры генома кластеровирусов варьируют от 14,5 до 19 kb [7, 8]. Рассмотрение особенностей структуры, репликации и экспрессии больших РНК-геномов является предметом настоящего обзора. Сравнение свойств нидовирусов и кластеровирусов позволяет увидеть парадоксальные черты сходства между этими эволюционно далекими друг от друга вирусами животных и растений.

КОРОНАВИРУСЫ

Представители порядка Nidovirales – артевиревирусы, коронавирусы, мезонивиревирусы и ронивиревирусы – весьма вариабельны с точки зрения размеров и структуры генома. Сравнение последовательностей аминокислот наиболее консервативного вирусного фермента, РНК-полимеразы, указывает, что нидовирусы образуют компактный филогенетический кластер [9] в филюме пикорна-подобных вирусов [10]. В настоя-

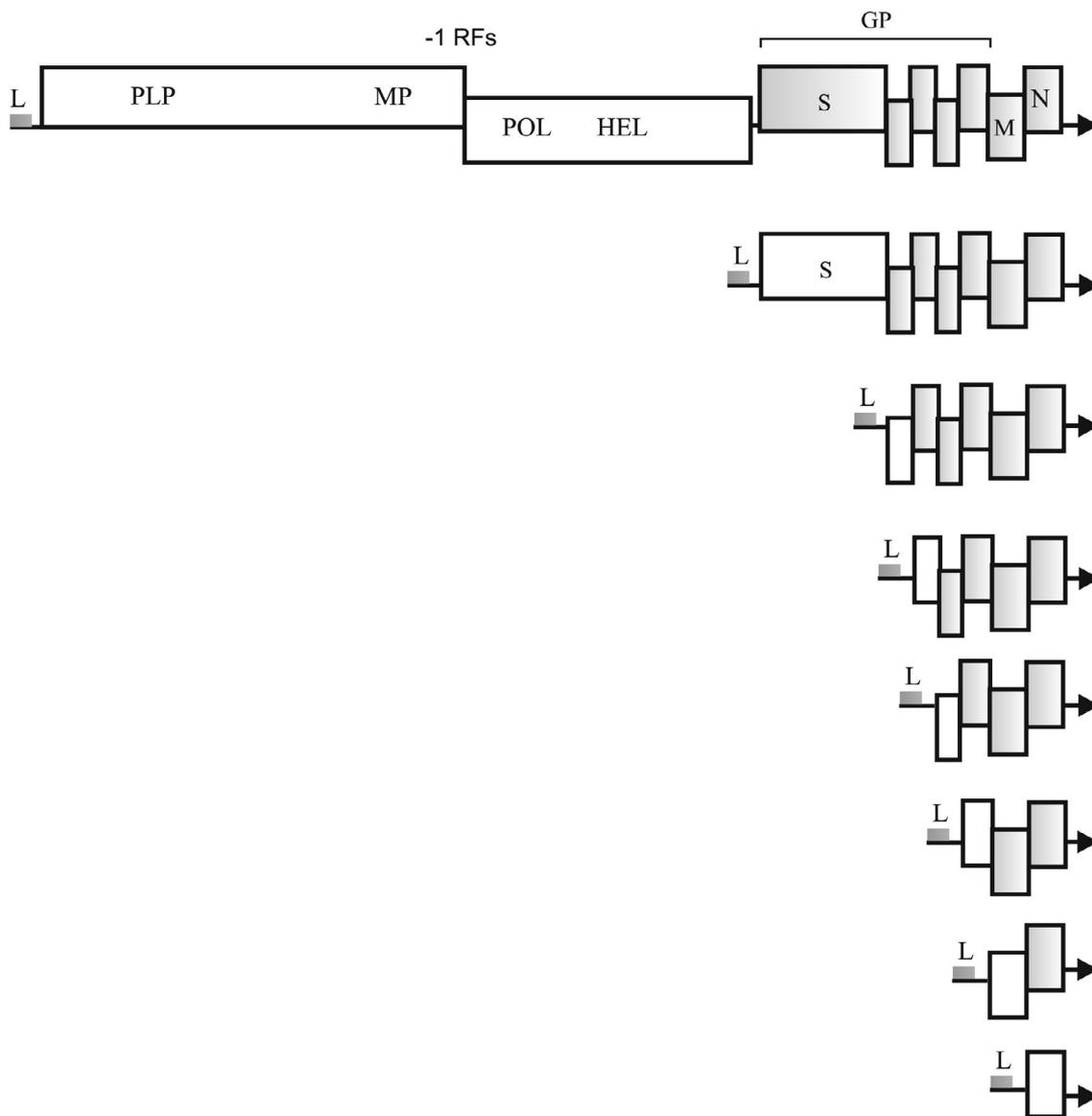


Рис. 1. Структура генома и субгеномных РНК коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV). L – лидерная последовательность; –1 RFs – сигнал –1 рибосомального сдвига рамки считывания. Обозначения закодированных белковых доменов: PLP – папаин-подобная протеиназа; MP – (главная) сериновая протеиназа; POL – РНК-полимераза; HEL – РНК-хеликаза; S – белок шипа; GP – вспомогательные белки и гликопротеины наружной мембраны; M – матриксный белок; N – белок нуклеокапсида. Гены, недоступные для трансляции в каждом типе мРНК, показаны затененными прямоугольниками. 3'-конец РНК обозначен стрелкой

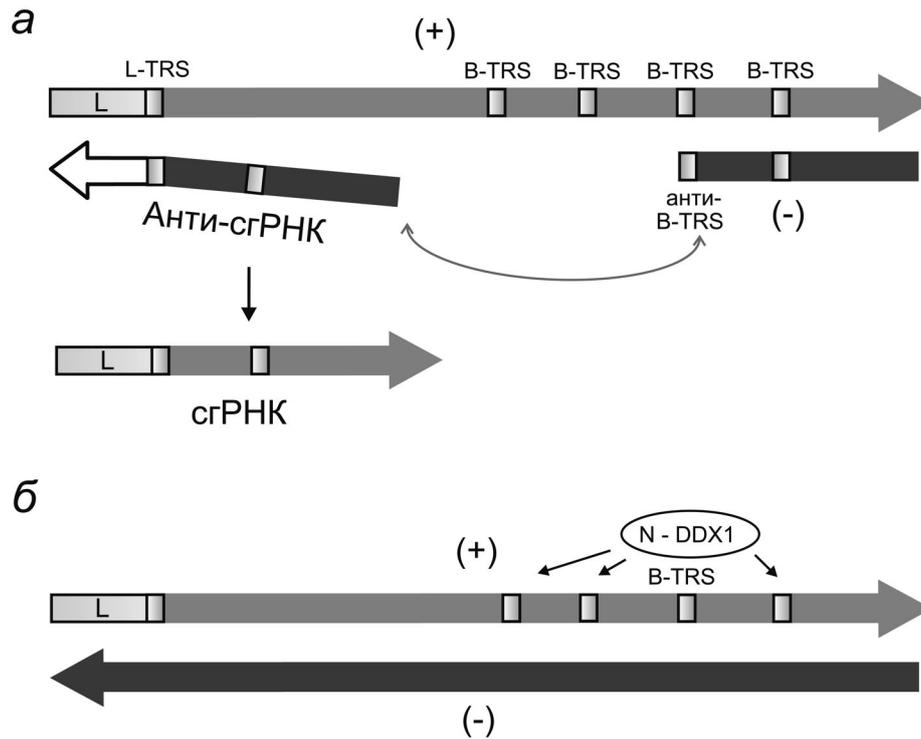


Рис. 2. Транскрипция и репликация РНК коронавирусов. *а* – Модель прерывистой транскрипции. При копировании геномной РНК может происходить остановка синтеза (–)-цепи на сигнале регуляции транскрипции В-TRS (показан прямоугольником), «перескок» антисубгеномной (–)-цепи РНК, отжиг анти-В-TRS на L-TRS и достройка цепи на матрице лидерной последовательности РНК (L). Кодированные и некодированные участки РНК изображены не в масштабе. *б* – Вирусный белок нуклеокапсида N и хеликаза DDX1 присоединяются к В-TRS, в результате чего стоп-сигналы TRS игнорируются и происходит процессивный синтез полноразмерной (–)-цепи РНК, а на матрице (–)-цепи – синтез дочерних (+)-цепей РНК (репликация). 3'-конец РНК обозначен стрелкой

шем обзоре мы ограничимся рассмотрением Coronaviridae, как наиболее эпидемиологически значимого и хорошо изученного семейства порядка Nidovirales.

Структура и экспрессия генома. Коронавирусы имеют спирально-симметричные нуклеокапсиды, которые окружены липопротеидной оболочкой, снабженной белком шипа и другими вирусными гликопротеинами [9]. Геномная РНК коронавирусов содержит 5'-концевую кеп-структуру и 3'-концевую поли(А)-последовательность. Открытые рамки трансляции (ОРТ) 1a и 1b, кодирующие компоненты репликазы, занимают 5'-концевую область генома (рис. 1). Трансляция этих генов с помощью механизма –1 рибосомального сдвига рамки считывания приводит к синтезу полипротеинов (pp) 1a и 1ab в молярном соотношении 4/1. pp1a и pp1ab коронавирусов содержат примерно 4 и 7 тыс. аминокислотных остатков (а.о.) соответственно. Процессинг pp1a и pp1ab вирусными протеинами приводит к образованию 16 неструктурных белков (nsp). Гены структурных белков – мембранных гликопротеинов, матриксного бел-

ка (М) и нуклеокапсидного белка (N) – находятся в 3'-концевой части генома и экспрессируются с помощью 3'-котерминальных субгеномных РНК (сгРНК) (рис. 1). Геномная и сгРНК несут на 5'-конце идентичные лидерные последовательности (L), длина которых составляет 60–90 нт.

Экспрессия 3'-концевых генов структурных белков коронавирусов происходит с участием набора сгРНК, в каждой из которых для трансляции доступен только 5'-проксимальный ген (рис. 1). Синтез нидовирусных сгРНК осуществляется с помощью уникального механизма прерывистой транскрипции [11, 12]. В цепи геномной РНК перед каждым геном (кроме ОРТ 1b) расположена консервативная последовательность длиной 6–8 нт – L-TRS (лидерный транскрипционный регуляторный сайт, leader transcription regulatory site, TRS) или В-TRS (body TRS) (рис. 2). Синтез антигеномной цепи (–)РНК с некоторой вероятностью может задерживаться на В-TRS в геномной РНК (рис. 2). Затем синтезированный фрагмент (–)-цепи либо «перескакивает» на 5'-конец (+)РНК, либо

участки сближаются в результате выпетливания (+)РНК. Происходит отжиг анти-В-TRS и L-TRS и достройка фрагмента (-)РНК на матрице (+)L (рис. 2, а). В результате получают анти-сРНК, содержащие общую последовательность анти-L, которые служат матрицами для образования сРНК. Фосфорилированный свободный белок нуклеокапсида N связывается с В-TRS и привлекает клеточную хеликазу DDX1; эти взаимодействия, осуществляемые на поздних стадиях инфекционного цикла, позволяют репликативному комплексу игнорировать стоп-сигналы транскрипции и синтезировать полноразмерную антигенную РНК, служащую матрицей для воспроизводства полноразмерных (+)РНК (рис. 2, б) [13, 14].

Репликативные белки. В состав репликативного комплекса коронавируса входит 16 неструктурных белков – продуктов процессинга *pp1a* и *pp1ab* папаин-подобной протеиназой (PLP) и сериновой протеиназы (MP) (рис. 3). Интересно, что родственные коронавирусы могут содержать один или два домена PLP [9]. В случае вируса мышинного гепатита (MHV) автокаталитическое высщепление *nsp1*, *nsp2*, *nsp3* и *nsp4* происходит под действием двух доменов PLP, тогда как в случае SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS и вируса инфекционного бронхита (IBV) за эти реакции ответственна единственная PLP (рис. 1 и 3). Таким образом, в процессе эволюции коронавирусов, очевидно, произошла дупликация и дивергенция доменов протеиназы. Процессинг большинства сайтов в полипротеинах осуществляется *in trans* вирусной сериновой протеиназой, получившей название «главной протеиназы» (MP) [9]. Специфические функции *nsp1* и *nsp2* коронавируса, по-видимому, связаны не с репликацией РНК, а с деградацией клеточных РНК и подавлением клеточной трансляции [15, 16], а также с созреванием вирусных частиц [17]. Искусственные мутации, блокирующие разрезание сайта *nsp1/nsp2*, и даже делеции *nsp1* и *nsp2* лишь

незначительно влияют на репликацию MHV в культуре клеток [18].

Многofункциональный белок *nsp3* несет домен протеиназы PLP и трансмембранный домен [19]. ТМ-белки *nsp3*, *nsp4* и *nsp6* индуцируют реорганизацию мембран клетки и создание репликативных компартментов [20–22]. Протеиназа *nsp5* осуществляет процессинг большинства сайтов в *pp1a* и *pp1ab* (рис. 3). Зрелый белок *nsp5* входит в состав репликативного комплекса. Функции малых белков *nsp7–nsp11* связаны с синтезом РНК, и все они необходимы для репликации. Белки *nsp7* и *nsp8* формируют цилиндрический комплекс из 8 субъединиц каждого белка, в котором положительно заряженные а.о. экспонированы в центральной полости. Уникальным свойством коронавируса (впервые обнаруженным у SARS-CoV-1) является участие в репликации белка *nsp8* в качестве вспомогательной РНК-полимеразы (гипотетической праймазы (Pr); рис. 3) [23], которая использует в качестве матриц последовательности РНК с консенсусом 5'-(G/U)CC и синтезирует короткие (до 6 нт) комплементарные РНК. Помимо низкой процессивности, *nsp8* является самой неточной РНК-полимеразой из всех известных ферментов данного типа (одна ошибка на 10 нт). Высказывались предположения, что Pr может выполнять функции праймазы при репликации РНК коронавируса или повышать процессивность РНК-полимеразы *nsp12* [23, 24].

Белок *nsp12* несет домены нуклеотидилтрансферазы и РНК-полимеразы и является сердцевинным РНК-синтезирующим ферментом коронавируса [24]. Белок *nsp13* содержит цинк-связывающий и хеликазный домены (рис. 3).

NSP14 содержит на N-конце домен 3'-5'-экзонуклеазы (Exo), а на C-конце – домен N7-гуанин-метилтрансферазы (Mtr; рис. 3). Предсказанные с помощью методов биоинформатики активности экзонуклеазы и метилтрансферазы

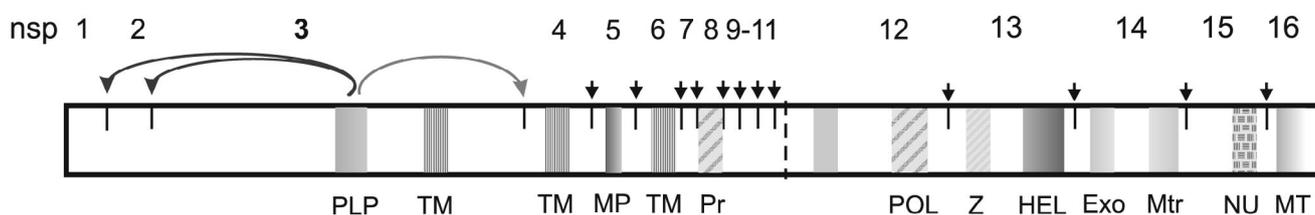


Рис. 3. Структура репликативного полипротеина 1ab коронавируса SARS-CoV-1. Вертикальный пунктирный отрезок – граница между 1a и 1b в слитном белке. Домены неструктурных белков *nsp1–nsp16* обозначены прямоугольниками. PLP – папаин-подобная протеиназа (сайты разрезания *in cis* показаны изогнутыми стрелками); MP – главная сериновая протеиназа (сайты разрезания *in trans* показаны стрелками); TM – трансмембранные домены; Pr – гипотетическая праймаза; POL – РНК-полимераза; Z – цинк-связывающий домен; HEL – РНК-хеликаза; Exo – 3'-5'-экзонуклеаза; Mtr – N7-гуанин-метилтрансфераза; NU – нидовирусная уридилат-специфичная эндорибонуклеаза; MT – рибозил-2'-О-метилтрансфераза

были подтверждены экспериментально [25–27]. Родственные коронавирусной Echo клеточные ферменты семейства DEDD участвуют в редактировании (proofreading), репарации и рекомбинации нуклеиновых кислот. При репликации коронавируса РНК nsp14 выполняет роль редактирующего фермента, повышающего точность копирования цепей; подобная функция уникальна для РНК-содержащих вирусов [25, 26].

NSP15 несет домен уридилат-специфичной эндонуклеазы (NU) (рис. 3) [28]. Коронавирусная NU необходима для репликации и транскрипции, а также является антагонистом интерферона. Белок NSP16 содержит домен рибозил-2'-О-метилтрансферазы (MT), осуществляющий метилирование второго остатка с 5'-конца коронавируса мРНК по 2'-О-положению рибозы (m⁷GpppAm) [29]. 2'-О-метилирование кепы позволяет клетке дискриминировать «свои» и «чужие» мРНК с помощью интерферон-индуцируемых IFIT-белков, и метилирование рибозного кольца второго остатка с 5'-конца вирусных РНК позволяет обойти этот механизм рестрикции [30].

Цитология репликации. После попадания в клетку коронавируса нуклеокапсид доставляется в эндосомы, где происходит освобождение РНК от белка N [31], свободная РНК выходит в цитоплазму и направляется к рибосомам. В результате трансляции синтезируются pp1a и pp1b, разрезаемые вирусными протеиназами с образованием репликативных белков. Гидрофобные белки nsp3, nsp4 и nsp6 связываются с мембранами аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума (ЭР) и формируют (очевидно, привлекая клеточные белки-партнеры) репликативные компартменты – двухслойные мембранные везикулы (DMV) и мультивезикулярные комплексы (MVC) [20, 21]. Репликативные белки и вирусная РНК связаны с мембранами DMV и MVC; в этих структурах («вирусных фабриках») происходит синтез вирусных РНК (антигеномной (–)-цепи, дочерних (+)-цепей и сгРНК) [22]. Геномные и сгРНК экспортируются в цитоплазму, где транслируются или служат матрицами для репликации во вновь образуемых вирусных фабриках. DMV коронавируса MCV и SARS-CoV-2 имеют каналы в цитоплазму, ключевым компонентом которых является белок nsp3, служащие для импорта молекул субстрата гНТР и экспорта вирусных мРНК [32].

КЛОСТЕРОВИРУСЫ

Семейство Closteroviridae объединяет около 40 РНК-содержащих вирусов растений [33, 34],

которые характеризуются несколькими отличительными свойствами: (1) переносятся насекомыми-векторами полуперсистентно (т.е. вирус задерживается в векторе в течение нескольких часов); (2) обладают уникальной структурой нитевидных частиц, построенных из нескольких структурных белков; (3) имеют большие РНК-геномы (до 20 kb); (4) несут ген гомолога клеточных шаперонов HSP70; (5) несут дублированные гены или фрагменты генов (например, гены основного и минорного структурных белков).

Структура и экспрессия генома. Геномная РНК вируса желтухи свеклы (BYV; 14,5 kb) содержит 5'-кеп и не имеет 3'-поли(А) [7, 33, 35]. В 5'-концевой области генома BYV и других кластеровирусов находятся ОПТ 1a и 1b, кодирующие компоненты репликазы (рис. 4) [7, 33, 34]. Трансляция этих генов, расположенных в конфигурации 0/+1, приводит к синтезу pp1a и pp1ab. Следует заметить, что механизм +1-сдвига рамки считывания у вирусов встречается достаточно редко, в отличие от –1-сдвига рамки считывания, который используется при экспрессии РНК-полимераз ретровирусов, коронавируса, астровирусов животных и лютеовирусов растений [7, 36], а также некоторых эукариотических генов и транспозонов [37]. Гены структурных и вспомогательных белков находятся в 3'-концевой части генома и экспрессируются с помощью 3'-котерминальных сгРНК [34] (рис. 4).

Папаин-подобная цистеиновая протеиназа PLP BYV автокаталитически выщепляет лидерный белок, гидролизует пептидную связь Gly588/589 [7]. В геномах некоторых кластеровирусов домен лидерной протеиназы дублирован, и выщепляется два лидерных белка [8]. Лидерный белок PLP BYV влияет на амплификацию вирусной РНК и транспорт инфекции по проводящим тканям растения (дальний транспорт) [38, 39]. Помимо выщепления PLP, pp1a подвергается дополнительному процессингу неизвестной протеиназной активностью, приводящему к появлению *in vivo* репликативных белков с молекулярной массой 63 kDa (с доменом Mtr) и 100 kDa (с доменом HEL) [40].

Мажорный структурный белок (CP; рис. 4) формирует «тело» нитевидной вирусной частицы, одевая 95% геномной РНК; минорный структурный белок (CPm) образует «хвост», включающий 5'-концевой фрагмент РНК [41, 42]. Формирование вирионов BYV невозможно без участия HSP70h и р64, и оба этих белка входят в состав зрелых частиц (в количестве одной или нескольких копий) [43–45]. Белок HSP70h имеет консервативный N-концевой домен АТРаза (гомологичный эквивалентным доме-

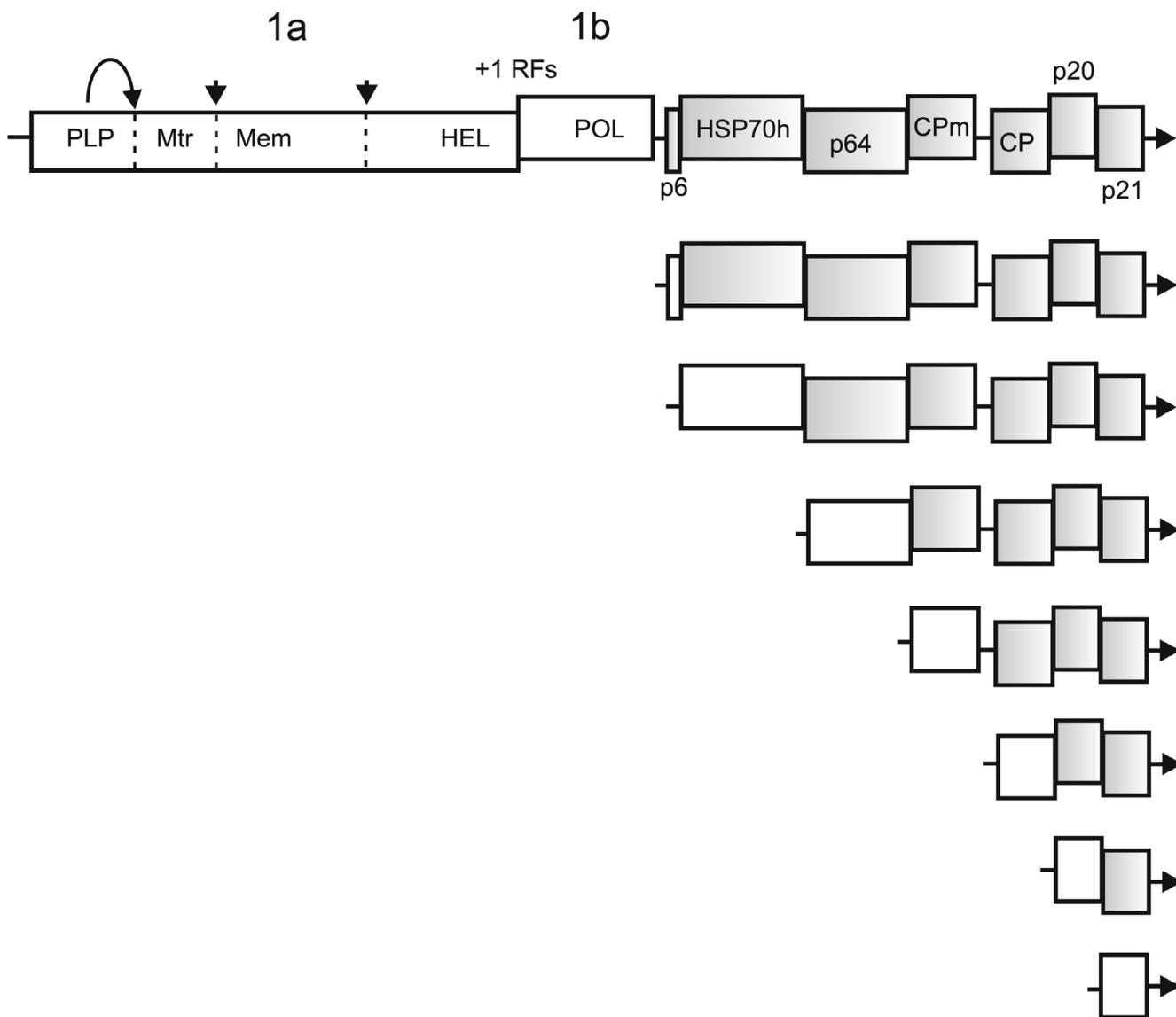


Рис. 4. Структура генома и субгеномных РНК кластеровируса желтухи свеклы (BYV). +1 RFS – сигнал +1 рибосомально-го сдвига рамки считывания при трансляции ОПТ 1а и 1b. Стрелки и пунктирные линии обозначают сайты разреза-ния рр1а. Обозначения закодированных белковых доменов: PLP – папаин-подобная протеиназа; Mtr – N7-гуанин-метил-трансфераза; Mem – мембраносвязывающий домен; HEL – РНК-хеликаза; POL – РНК-полимераза; р6 – малый гидро-фобный белок; HSP70h – гомолог белков теплового шока семейства HSP70; р64 – минорный структурный белок; CPm – минорный структурный белок; CP – мажорный структурный белок. Гены, недоступные для трансляции в каждом типе мРНК, показаны затененными прямоугольниками

нам клеточных HSP70) и варибельный С-кон-цевой домен [46]. Было показано, что N-конце-вой домен HSP70h обладает Mg-зависимой АТФазной активностью *in vitro*, однако, в отли-чие от клеточных шаперонов семейства HSP70, не способен взаимодействовать с развернутыми белковыми цепями [47]. Помимо вирусных час-тиц, HSP70h связывается с плазмодесмами зара-женных клеток и выполняет функции белка межклеточного транспорта [48, 49]. Функция транспорта также зависит от р6, р64, CP и CPm.

Нокаут каждого из генов, кодирующих эти бел-ки, блокирует распространение инфекции BYV по растению [50]. Функции продуктов 3'-конце-вых генов (рис. 4) связаны с дальним транспор-том инфекции (р20) и подавлением пост-тран-скрипционного у молчания генов (р21) [51].

Репликативные белки. Кластеровирусы от-носятся к супергруппе альфа-подобных вирусов, включающей (+)РНК-содержащие вирусы жи-вотных (вирус Синдбис, вирус краснухи и вирус гепатита Е) и растений (вирус табачной мозаи-

ки, вирус мозаики костра и другие). При всем несходстве биологических свойств, структуры вирионов и строения РНК-генома все альфа-подобные вирусы содержат консервативные домены Mtr, РНК-хеликазы (Hel) и РНК-полимеразы (POL) в составе репликазы [52, 53]. Домен Mtr обладает активностями гуанилилтрансферазы и N7-гуанин-метилтрансферазы и осуществляет кепирование вирусных мРНК. Домен HEL расплетает цепи РНК при репликации за счет энергии гидролиза NTP. Домен POL ответственен за синтез комплементарных цепей РНК; у альфа-подобных вирусов синтез РНК инициируется *de novo* и не требует затравки [54].

Сравнение вирусных (+)РНК-геномов позволяет увидеть простую закономерность: чем больше размеры геномной РНК, тем протяженнее ген РНК-репликазы; иными словами, большой геном реплицируется более сложно устроенным репликативным комплексом [33]. При эволюции альфа-подобных вирусов, очевидно, происходили вставки кодирующей последовательности между доменами Mtr и HEL при сохранении длины спейсера между HEL и POL [33]. Репликативный комплекс кластеровирусов устроен сложнее, чем у родственных вирусов растений, и включает, по крайней мере, пять белков (PLP, Mtr, центральный домен 1a, HEL и HEL-POL) [34]. В белке 1a не были предсказаны домены, эквивалентные экзонуклеазе и праймазе нидовирусов, и остается неизвестным существуют ли у кластеровирусов ферментативные активности, способствующие процессивности и точности синтеза РНК [51]. Репликация генома кластеровирусов происходит по общему для альфа-подобных вирусов механизму — репликация инициируется после узнавания репликазой *цис*-сигнала на 3'-конце (+)РНК, синтезируется полноразмерная комплементарная (–)-цепь, на матрице которой синтезируются дочерние (+)-цепи. До сих пор не были получены экспериментальные данные в пользу одного из двух возможных вариантов транскрипции — синтеза сгРНК на матрице полноразмерной (–)РНК или на матрицах антисубгеномных (–)РНК [54]. По-видимому, механизм прерывистой транскрипции не используется в кластеровирусных системах, поскольку сгРНК кластеровирусов не имеют общей 5'-лидерной последовательности, а районы субгеномных промоторов не несут общих элементов, напоминающих TRS нидовирусов [55–58].

Цитология репликации. Инфекция кластеровирусов в растениях сопровождается образованием DMV (везикул диаметром ~100 нм, окруженных двойной мембраной) и MVC (скопления везикул, окруженных общей однослойной

мембраной) [59], напоминающих репликативные ультраструктуры нидовирусов и флавиовирусов [60]. DMV и MVC формируются из мембран ЭР. Репликативные белки BVV — PLP, Mtr и HEL — ассоциированы с этими структурами, что подтверждает их связь с репликацией РНК [61, 62]. В поисках белков BVV, способных модифицировать клеточные мембраны, были проведены эксперименты по кратковременной (транзистентной) экспрессии фрагментов центрального района белка 1a, слитых с репортерным белком GFP, в растениях *Nicotiana benthamiana* [60, 63]. Фрагмент длиной 198 а.о. (Mem; рис. 4), включающий консервативный гидрофобный домен с вероятной амфипатической альфа-спиралью, вызывал в клетках растений трансформацию ЭР вокруг ядра и образование скоплений глобул диаметром ~2 мкм. Глобулы обладали подвижностью, зарегистрированной с помощью конфокальной микроскопии, и ассоциировались с актиновыми филаментами [63]. Высказывалось предположение, что реорганизация мембран ЭР под действием гидрофобного сегмента pp1a является одним из этапов создания репликативных ультраструктур у кластеровирусов [60, 63].

ОБЩИЕ ПУТИ ЭВОЛЮЦИИ БОЛЬШИХ РНК-ГЕНОМОВ

В процессе эволюции нидовирусы животных и кластеровирусы растений преодолели барьер размера (+)РНК-генома в 12 kb. При этом с помощью ряда эволюционных «изобретений» были решены проблемы упаковки и репликации. По остроумной гипотезе Godeny et al. [64], предок современных Nidovirales, скорее всего, имел икосаэдрический нуклеокапсид. При последующей дивергенции «малые нидовирусы» (геном 14–16 kb) сохранили такой тип нуклеокапсида, а «большие нидовирусы» (геном 26–41 kb) в результате рекомбинации приобрели новый белок N, образующий спирально-симметричный нуклеокапсид и позволяющий упаковывать РНК значительно большего размера. Родственные кластеровирусам альфа-подобные вирусы растений — бромовирус мозаики костра и тобамовирус табачной мозаики — имеют икосаэдрические и палочковидные частицы соответственно. Размер РНК, который возможно упаковать в такие частицы, существенно ограничен; создание в процессе эволюции сверхгибких спирально-симметричных частиц кластеровирусов, состоящих из нескольких белков, позволило решить проблему упаковки РНК-генома размером до 19 kb [5].

Мутации, вносимые собственными РНК-полимеразами [2] и, возможно, клеточными редактирующими ферментами (например, дезаминазами) [65], являются основой изменчивости РНК-вирусов. Другой движущей силой вирусной эволюции является рекомбинация РНК [66]. Анализ геномов коронавирусов и кластеровирусов позволяет выявить явные следы рекомбинационных событий: захвата гетерологичных последовательностей, дубликации и дивергенции генов. Так, эволюция «больших нидовирусов» сопровождалась приобретением как новых ферментативных активностей (нуклеотидилтрансферазы, праймазы, 3'-5'-экзонуклеазы, эндонуклеазы) [9], так и структурных генов (белка нуклеокапсиды и белка внешней мембраны, родственного гемагглютинину вируса гриппа) [67]. В ходе эволюции кластеровирусов и коронавирусов происходила дубликация и последующая дивергенция последовательностей, кодирующих лидерную протеиназу РLP. В геномах кластеровирусов ген структурного белка был, вероятно, дублирован несколько раз, в результате чего возникли CP, CPm (некоторые представители семейства несут два CPm-подобных гена) и р64 (рис. 4) [34, 51]. Кроме того, при эволюции кластеровирусов произошел захват хозяйского гена HSP70 (за счет вероятной рекомбинации с клеточной мРНК) и его приспособление к выполнению определенных функций при сборке частиц и межклеточном транспорте [33, 51].

Синтез больших РНК «обслуживается» более сложно устроенными РНК-репликазами, и существенная часть увеличений размера РНК-гена приходится на репликативные гены [33]. Коронавирусы обладают ферментативными активностями, позволяющими повысить точность и процессивность РНК-полимеразы (праймазы и экзонуклеазы). Геномы кластеровирусов не кодируют эквивалентных белков. Возможно, это отражается в более высоком уровне точечных мутаций у кластеровируса тристецы цитрусовых (CTV) [68] в сравнении с SARS-CoV и другими коронавирусами [65]. Среди представителей Nidovirales коронавирусы и ронивирусы (геном 26–41 kb) кодируют домен экзонуклеазы, а мезонивирусы и артеривирусы (геном 14–20 kb) лишены этого домена. Возможно, 20 kb являет-

ся пределом размеров вирусной РНК, копирование которой не требует дополнительной редактирующей активности.

Сравнение структуры и экспрессии геномов коронавирусов и кластеровирусов выявляет удивительное сходство между этими группами (рис. 1 и 4). Геномы нидовирусов и кластеровирусов содержат 5'-проксимальные гены репликазы, экспрессируемые с помощью рибосомального сдвига рамки считывания с образованием крупных рр1a и рр1ab. Полипротеины процессируются одной или двумя папаин-подобными протеиназами, высвобождающими лидерные белки, а также сериновой МР (нидовирусы) или неидентифицированной протеиназой (кластеровирусы), в результате чего образуются зрелые белки с активностями метилтрансферазы, хеликазы, РНК-полимеразы и мембраносвязывающими доменами. Гены вспомогательных и структурных белков транслируются с матриц 3'-котерминальных сгРНК (рис. 1 и 4). Это сходство не должно создавать впечатление, что эти вирусы животных и растений произошли от общего предка, имевшего сходным образом устроенный геном и набор механизмов экспрессии генов – напротив, кластеровирусы и нидовирусы представляют эволюционно удаленные друг от друга группы [1, 10]. Более уместным представляется допущение, что сходные черты геномной организации и экспрессии нидовирусов и коронавирусов возникли в ходе эволюции предков этих вирусов конвергентно, как следствие увеличения размеров РНК-гена, сделавшего необходимым приобретение сходного набора функций и способов экспрессии вирусных генов [5, 7, 34, 51].

Благодарности. Автор выражает признательность проф. А.Г. Соловьеву и проф. С.Ю. Морозову за обсуждение и критические замечания по тексту настоящего обзора.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koonin, E. V., and Dolja, V. V. (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 375-430, doi: 10.3109/10409239309078440.
2. Steinhauer, D. A., and Holland, J. (1987) Rapid evolution of RNA viruses, *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 409-431, doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002205.
3. Drake, J. W. (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4171-4175.
4. Holmes, E. C. (2003) Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution, *Trends Microbiol.*, **11**, 543-546.
5. Dolja, V. V., Karasev, A. V., and Koonin, E. V. (1994) Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophis-

- ticated build-up of large RNA genomes, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 261-285.
6. Saberi, A., Gulyaeva, A. A., Brubacher, J. L., Newmark, P. A., and Gorbalenya, A. E. (2018) A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size, *PLoS Pathog.*, **14**, e1007314, doi: 10.1371/journal.ppat.1007314.
 7. Agranovsky, A. A., Koonin, E. V., Boyko, V. P., Maiss, E., Froetschl, R., Lunina, N. A., and Atabekov, J. G. (1994) Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease, *Virology*, **198**, 311-324, doi: 10.1006/viro.1994.1034.
 8. Karasev, A. V., Boyko, V. P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Hilf, M. E., et al. (1995) Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome, *Virology*, **208**, 511-520, doi: 10.1006/viro.1995.1182.
 9. Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., de Groot, R. J., Cowley, J. A., Ziebuhr, J., and Snijder, E. J. (2008) Nidovirales, in *Encyclopedia of Virology* (Mahy, B. W. J., and Van Regenmortel, M. H. V., eds) Oxford, Elsevier, pp. 419-430.
 10. Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y. I., et al. (2020) Global organization and proposed megataxonomy of the virus world, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **84**, e00061-19, doi: 10.1128/MMBR.00061-19.
 11. Sawicki, S. G., and Sawicki, D. L. (2005) Coronavirus transcription: a perspective, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **287**, 31-55, doi: 10.1007/3-540-26765-4_2.
 12. Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., and Enjuanes, L. (2015) Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses, *Annu. Rev. Virol.*, **2**, 265-288, doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055218.
 13. Zúñiga, S., Cruz, J. L., Sola, I., Mateos-Gomez, P. A., Palacio, L., and Enjuanes, L. (2010) Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription, *J. Virol.*, **84**, 2169-2175.
 14. Wu, C. H., Chen, P. J., and Yeh, S. H. (2014) Nucleocapsid phosphorylation and RNA helicase DDX1 recruitment enables coronavirus transition from discontinuous to continuous transcription, *Cell Host Microbe*, **16**, 462-72.
 15. Terada, Y., Kawachi, K., Matsuura, Y., and Kamitani, W. (2017) MERS coronavirus nsp1 participates in an efficient propagation through a specific interaction with viral RNA, *Virology*, **511**, 95-105, doi: 10.1016/j.virol.2017.08.026.
 16. Lokugamage, K. G., Narayanan, K., Huang, C., and Makino, S. (2012) Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein nsp1 is a novel eukaryotic translation inhibitor that represses multiple steps of translation initiation, *J. Virol.*, **86**, 13598-13608, doi: 10.1128/JVI.01958-12.
 17. Nakagawa, K., Narayanan, K., Wada, M., Popov, V. L., Cajimat, M., Baric, R. S., and Makino, S. (2018) The endonucleolytic RNA cleavage function of nsp1 of middle east respiratory syndrome coronavirus promotes the production of infectious virus particles in specific human cell lines, *J. Virol.*, **92**, e01157-18, doi: 10.1128/JVI.01157-18.
 18. Graham, R. L., Sims, A. C., Brockway, S. M., Baric, R. S., and Denison, M. R. (2005) The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication, *J. Virol.*, **79**, 13399-13411, doi: 10.1128/JVI.79.21.13399-13411.2005.
 19. Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., Younker, D., Meyer, Y., Thiel, V., Stokes, H., and Siddell, S. G. (2005) Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins, *PLoS Pathog.*, **1**, e39, doi: 10.1371/journal.ppat.0010039.
 20. Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W., and Buchmeier, M. J. (2013) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles, *MBio*, **4**, e00524-e00513.
 21. de Wilde, A. H., Snijder, E. J., Kikkert, M., and van Hemert, M. J. (2018) Host factors in coronavirus replication, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **419**, 1-42, doi: 10.1007/82_2017_25.
 22. Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., et al. (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum, *PLoS Biol.*, **6**, e226, doi: 10.1371/journal.pbio.0060226.
 23. Te Velthuis, A. J., van den Worm, S. H., and Snijder, E. J. (2012) The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension, *Nucleic Acids Res*, **40**, 1737-1747, doi: 10.1093/nar/gkr893.
 24. Kirchdoerfer, R. N., and Ward, A. B. (2019) Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors, *Nat. Commun.*, **10**, 2342, doi: 10.1038/s41467-019-10280-3.
 25. Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B., and Decroly, E. (2012) RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus non-structural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9372-9377, doi: 10.1073/pnas.1201130109.
 26. Subissi, L., Posthuma, C. C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Gorbalenya, A. E., et al. (2014) One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E3900-9, doi: 10.1073/pnas.1323705111.
 27. Jin, X., Chen, Y., Sun, Y., Zeng, C., Wang, Y., et al. (2013) Characterization of the guanine-N7 methyltransferase activity of coronavirus nsp14 on nucleotide GTP, *Virus Res.*, **176**, 45-52, doi: 10.1016/j.virusres.2013.05.001.
 28. Ivanov, K. A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E., and Ziebuhr, J. (2004) Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12694-12699, doi: 10.1073/pnas.0403127101.
 29. Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., and Guo, D. (2009) Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3484-3489.
 30. Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., et al. (2010) 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members, *Nature*, **468**, 452-456, doi: 10.1038/nature09489.
 31. Kalicharran, K., Mohandas, D., Wilson, G., and Dales, S. (1996) Regulation of the initiation of coronavirus JHM infection in primary oligodendrocytes and L-2 fibroblasts, *Virology*, **225**, 33-43, doi: 10.1006/viro.1996.0572.
 32. Wolff, G., Ronald, W., Limpens R., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Laugks, U., et al. (2020) A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle, *Science*, **369**, 1395-1398, doi: 10.1126/science.abd3629.
 33. Agranovsky, A. A. (1996) Principles of molecular organization, expression and evolution of closteroviruses: over the barriers, *Adv. Virus Res.*, **47**, 119-158.
 34. Agranovsky A. A. (2016) Closteroviruses: molecular biology, evolution and interactions with cells, in *Plant Viruses: Evolution and Management* (Gaur, R. K., Petrova, N., and Stoyanova, M. I., eds) Springer Science+Business Media, Singapore, Chapt. 14, pp. 231-252, doi: 10.1007/978-981-10-1406-2_14.
 35. Agranovsky, A. A., Boyko, V. P., Karasev, A. V., Lunina, N. A., Koonin, E. V., and Dolja, V. V. (1991) Nucleotide

- sequence of the 3'-terminal half of beet yellows closterovirus RNA genome: unique arrangement of eight virus genes, *J. Gen. Virol.*, **72**, 15-23.
36. Firth, A. E., Brierley, I. (2012) Non-canonical translation in RNA viruses, *J. Gen. Virol.*, **93**, 1385-1409, doi: 10.1099/vir.0.042499-0.
 37. Giedroc, D. P., and Cornish, P. V. (2009) Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism, *Virus Res.*, **139**, 193-208.
 38. Peremyslov, V. V., Hagiwara, Y., and Dolja, V. V. (1998) Genes required for replication of the 15.5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus, *J. Virol.*, **72**, 5870-5876.
 39. Peng, C. W., Napuli, A. J., and Dolja, V. V. (2003) Leader proteinases of beet yellows virus functions in long-distance transport, *J. Virol.*, **77**, 2843-2849.
 40. Erokhina, T. N., Zinovkin, R. A., Vitushkina, M. V., Jelkmann, W., and Agranovsky, A. A. (2000) Detection of beet yellows closterovirus methyltransferase-like and helicase-like proteins *in vivo* using monoclonal antibodies, *J. Gen. Virol.*, **81**, 597-603.
 41. Agranovsky, A. A., Lesemann, D. E., Maiss, E., Hull, R., and Atabekov, J. G. (1995) "Rattlesnake" structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2470-2473.
 42. Zinovkin, R. A., Jelkmann, W., and Agranovsky, A. A. (1999) The minor coat protein of beet yellows closterovirus encapsidates the 5'-terminus of RNA in virions, *J. Gen. Virol.*, **80**, 269-272.
 43. Napuli, A. J., Alzhanova, D. V., Doneanu, C. E., Barofsky, D. F., Koonin, E. V., and Dolja, V. V. (2003) The 64-kDa capsid protein homolog of beet yellows virus is required for assembly of virion tails, *J. Virol.*, **77**, 2377-2384.
 44. Napuli, A. J., Falk, B. W., and Dolja, V. V. (2000). Interaction between HSP70 homolog and filamentous virions of the beet yellows virus, *Virology*, **274**, 232-239.
 45. Alzhanova, D. V., Napuli, A., Creamer, R., and Dolja, V. V. (2001) Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog, *EMBO J.*, **20**, 6997-7007.
 46. Agranovsky, A. A., Boyko, V. P., Karasev, A. V., Koonin, E. V., and Dolja, V. V. (1991) The putative 65K protein of beet yellows closterovirus is a homologue of HSP70 heat shock proteins, *J. Mol. Biol.*, **217**, 603-610.
 47. Agranovsky, A. A., Folimonova, S. Y., Folimonov, A. S., Denisenko, O. N., and Zinovkin, R. A. (1997) The beet yellows closterovirus p65 homologue of HSP70 chaperones has ATPase activity associated with its conserved N-terminal domain but does not interact with unfolded protein chains, *J. Gen. Virol.*, **78**, 535-542.
 48. Medina, V., Peremyslov, V. V., Hagiwara, Y., and Dolja, V. V. (1999) Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus, *Virology*, **260**, 173-181.
 49. Agranovsky, A. A., Folimonov, A. S., Folimonova, S. Y., Morozov, S. Y., Schiemann, J., Lesemann, D. E., and Atabekov, J. G. (1998) Beet yellows closterovirus HSP70-like protein mediates the cell-to-cell movement of a potyvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus, *J. Gen. Virol.*, **79**, 889-895.
 50. Alzhanova, D. V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V. V., and Dolja, V. V. (2000) Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus, *Virology*, **268**, 192-200.
 51. Dolja, V. V., Kreuzer, J. F., and Valkonen, J. P. (2006) Comparative and functional genomics of closteroviruses, *Virus Res.*, **117**, 38-51.
 52. Goldbach, R., Le Gall, O., and Wellink, J. (1991) Alpha-like viruses of plants, *Semin. Virol.*, **2**, 19-25.
 53. Buck, K. W. (1996) Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals, *Adv. Virus Res.*, **47**, 159-251, doi: 10.1016/s0065-3527(08)60736-8.
 54. Miller, W. A., and Koev, G. (2000) Synthesis of subgenomic RNAs by positive strand RNA viruses, *Virology*, **273**, 1-8.
 55. Agranovsky, A. A., Koenig, R., Maiss, E., Boyko, V. P., Casper, R., and Atabekov, J. G. (1994) Expression of the beet yellows closterovirus capsid protein and p24, a capsid protein homologue, *in vitro* and *in vivo*, *J. Gen. Virol.*, **75**, 1431-1439.
 56. Karasev, A. V., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., and Dawson, W. O. (1997) Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5' termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNAs, *J. Virol.*, **71**, 6233-6236.
 57. Peremyslov, V. V., and Dolja, V. V. (2002) Identification of the subgenomic mRNAs that encode 6-kDa movement protein and Hsp70 homolog of beet yellows virus, *Virology*, **295**, 299-306.
 58. Vitushkina, M. V., Rogozin, I. B., Jelkmann, W., Koonin, E. V., and Agranovsky, A. A. (2007) Completion of the mapping of transcription start sites for the five-gene block subgenomic RNAs of beet yellows closterovirus and identification of putative subgenomic promoters, *Virus Res.*, **128**, 153-158.
 59. Cronshaw, J., Hoefert, L., and Esau, K. (1966) Ultrastructural features of beta leaves infected with beet yellows virus, *J. Cell. Biol.*, **31**, 429-443.
 60. Gushchin, V. A., Solovyev, A. G., Erokhina, T. N., Morozov, S. Y., and Agranovsky, A. A. (2013) Beet yellows virus replicase and replicative compartments: parallels with other RNA viruses, *Front. Microbiol.*, **4**, 38, doi: 10.3389/fmicb.2013.00038.
 61. Erokhina, T. N., Vitushkina, M. V., Zinovkin, R. A., Lesemann, D. E., Jelkmann, W., Koonin, E. V., and Agranovsky, A. A. (2001) Ultrastructural localisation and epitope mapping of beet yellows closterovirus methyltransferase-like and helicase-like proteins, *J. Gen. Virol.*, **82**, 1983-1994.
 62. Zinovkin, R. A., Erokhina, T. N., Lesemann, D. E., Jelkmann, W., and Agranovsky, A. A. (2003) Processing and subcellular localization of the leader papain-like proteinase of beet yellows closterovirus, *J. Gen. Virol.*, **84**, 2265-2270.
 63. Gushchin V. A., Karlin, D. G., Makhotenko, A. V., Khromov, A. V., Erokhina T. N., et al. (2017) A conserved region in the Closterovirus 1a polyprotein drives extensive remodeling of endoplasmic reticulum membranes and induces motile globules in *Nicotiana benthamiana* cells, *Virology*, **506**, 106-113, doi: 10.1016/j.virol.2016.12.006.
 64. Godeny, E. K., Chen, L., Kumar, S., Methven, S. L., Koonin, E. V., and Brinton, M. A. (1993) Complete genome sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV), *Virology*, **194**, 585-96.
 65. Simmonds, P. (2020) Rampant C/U hypermutation in the genomes of SARS-CoV-2 and other coronaviruses: causes and consequences for their short- and long-term evolutionary trajectories, *mSphere*, **5**, e00408-20, doi: 10.1128/mSphere.00408-20.
 66. Bentley, K., and Evans, D. J. (2018) Mechanisms and consequences of positive-strand RNA virus recombination, *J. Gen. Virol.*, **99**, 1345-1356, doi: 10.1099/jgv.0.001142.
 67. Zeng, Q., Langereis, M. A., van Vliet A. L., Huizinga, E. G., and de Groot, R. J. (2008) Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9065-9069, doi: 10.1073/pnas.080052105.
 68. Harper, S. J. (2013) Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups, *Front. Microbiol.*, **4**, 9310, doi: 3389/fmicb.2013.00093.

**STRUCTURE AND EXPRESSION OF LARGE POSITIVE-SENSE
RNA GENOMES OF EUKARYOTIC VIRUSES****Mini-Review****A. A. Agranovsky***Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; E-mail: etdonas2@gmail.com*

Viral positive-sense RNA genomes evolve rapidly due to the high mutation rates during replication and RNA recombination, which allowing the viruses to acquire and modify genes for their adaptation. The size of RNA genome is limited by several factors, including low fidelity of RNA polymerases and packaging constraints. However, the 12-kb size limit is exceeded in the two groups of eukaryotic (+)RNA viruses – animal nidoviruses and plant closteroviruses. These virus groups have several traits in common. Their genomes contain 5'-proximal genes that are expressed via ribosomal frameshifting and encode one or two papain-like protease domains, membrane-binding domain(s), methyltransferase, RNA helicase, and RNA polymerase. In addition, some nidoviruses (i.e., coronaviruses) contain replication-associated domains, such as proofreading exonuclease, putative primase, nucleotidyltransferase, and endonuclease. In both nidoviruses and closteroviruses, the 3'-terminal part of the genome contains genes for structural and accessory proteins expressed via a nested set of coterminal subgenomic RNAs. Coronaviruses and closteroviruses have evolved to form flexuous helically symmetrical nucleocapsids as a mean to resolve packaging constraints. Since phylogenetic reconstructions of the RNA polymerase domains indicate only a marginal relationship between the nidoviruses and closteroviruses, their similar properties likely have evolved convergently, along with the increase in the genome size.

Keywords: viral positive-sense RNA genomes, nidoviruses, SARS-CoV, closteroviruses, evolution, gene expression

УДК 576.385.5

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ NOX-2 И Nrf-2 СПОСОБСТВУЕТ ВОЗНИКНОВЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА (HCT-116) К ДЕЙСТВИЮ 5-ФТОРУРАЦИЛА*

© 2021 Б.Н. Вагхела¹, Ф.У. Вайдия¹, Ч. Патхак^{1,2**}

¹ School of Biological Sciences & Biotechnology, Indian Institute of Advanced Research, Koba Institutional Area, 382426 Gandhinagar, India; E-mail: cmpathak@iiar.res.in

² Amity Institute of Biotechnology, Amity University, 122413 Gurgaon, India

Поступила в редакцию 14.07.2020

После доработки 21.09.2020

Принята к публикации 21.09.2020

Изменения внутриклеточной экспрессии редокс-генов и уровня соответствующих белков оказывают влияние на инвазию, метастазирование и лекарственную устойчивость при раке. Изоформы NADPH-оксидазы (NOX) представляют собой прооксидантные белки, которые генерируют в качестве первичного продукта активные формы кислорода (АФК). Нарушения регуляции экспрессии и активности NOX приводят к изменению уровня АФК, что прямо или косвенно оказывает влияние на сигнальные пути, определяющие гибель или выживание клеток при прогрессировании рака. Ядерный фактор Nrf-2 является индуцибельным фактором транскрипции, который участвует в транскрипции целого набора антиоксидантных генов и защищает опухолевые клетки от влияния окислительного стресса. Как NOX, так и Nrf-2 участвуют в регуляции редокс-гомеостаза внутри клеток, и нарушение регуляции их активности способствует возникновению окислительного стресса, который, в свою очередь, вносит вклад в прогрессирование различных типов рака. В то же время роль изоформ NOX и Nrf-2 в развитии фенотипа лекарственной резистентности до сих пор не выяснена. В настоящей работе нами была изучена связь между изоформами NOX и Nrf-2-опосредованным сигнальным путем и экспрессией гена *MDR1* в клетках карциномы толстой кишки (HCT-116/R). Для получения резистентных клеток HCT-116/R была достигнута повышенная экспрессия гена *MDR1*; в этих клетках регистрировали уровень активации NOX и образование АФК. Кроме того, нами была проведена оценка роли изоформ NOX и Nrf-2 в гибели клеток HCT-116/R в результате апоптоза, индуцированного 5-фторурацилом (5-FU). Мы обнаружили, что клетки HCT-116/R демонстрируют повышенную экспрессию HIF-1 α , Nrf-2 и HO-1 и обладают повышенной устойчивостью к действию 5-FU. В этих клетках также была повышена экспрессия и активность NOX-2. Кроме того, в клетках был отмечен повышенный уровень АФК. Следует отметить, что воздействие HDC, который является специфическим ингибитором NOX-2, на клетки HCT-116/R приводило к снижению уровня АФК. В то же время воздействие на клетки специфических ингибиторов, таких как HDC (NOX-2) и ML-385 (Nrf-2), усиливало 5-FU-опосредованную гибель клеток HCT-116/R в результате апоптоза, что позволяет предположить, что NOX-2 и Nrf-2 участвуют в развитии у клеток устойчивости к действию лекарств. Таким образом, гены *NOX-2* и *Nrf-2*, возможно, являются вновь выявленными ускорителями возникновения лекарственной устойчивости клеток колоректального рака, и они могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней для преодоления лекарственной резистентности при колоректальном раке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 5-фторурацил, лекарственная резистентность, HO-1, MDR1, NOX-2, Nrf-2, АФК.

DOI: 10.31857/S0320972521030039

ВВЕДЕНИЕ

Рак толстой кишки является одной из основных причин смерти во всем мире, и для него

характерен высокий уровень смертности [1]. Для лечения рака в основном применяются такие подходы, как химиотерапия и хирургические методы вмешательства. Однако опухолевые

Принятые сокращения: ABC – АТФ-связывающий кассетный транспортер; АФК – активные формы кислорода; DPBS – физиологический раствор Дульбекко; DPI – дифенилен-йодоний; 5-FU – 5-фторурацил; HDC – гистамин дигидрохлорид; H₂DCFDA – краситель 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат; *MDR1* – ген множественной лекарственной устойчивости 1; ML171 – ингибитор NOX-1; ML385 – ингибитора Nrf-2; MTT – краситель тиазолил синий тетразолий бромид; NBT – нитросиний тетразолий; NOX – NADPH-оксидазы, Nrf-2 – ядерный эритроид-подобный фактор 2; P-gp – P-гликопротеин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biohimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-221, 08.03.2021.

** Адресат для корреспонденции.

клетки после начала применения противораковых лекарств быстро становятся невосприимчивыми к действию химических препаратов. Возникновение устойчивости опухолевых клеток к действию химиотерапевтических агентов является серьезным препятствием для успешного применения лекарств при терапии рака [2]. Возникновение фенотипов раковых клеток, устойчивых к действию лекарств, происходит в результате нарушения функционирования сложных молекулярных механизмов [3]. Механически различные нарушения функционирования клеток связаны с развитием лекарственной резистентности, которая проявляется в таких явлениях, как инактивация лекарств, изменения мишеней для действия лекарств, отток лекарств из клеток, репарация поврежденных участков ДНК, ингибирование процесса гибели клеток, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT – epithelial to mesenchymal transition), свойственная клеткам гетерогенность, эпигенетические эффекты и любые комбинации этих механизмов [4, 5].

Есть неопровержимые доказательства того, что развитие лекарственной резистентности раковых клеток обусловлено повышением экспрессии белков, участвующих в выбросе лекарств из клеток или в снижении уровня поглощаемого клетками противоракового вещества. Одним из наиболее хорошо изученных механизмов лекарственной устойчивости раковых клеток является повышение экспрессии белков семейства АТР-связывающего кассетного транспортера (ABC – АТР-binding cassette), которые способствуют оттоку из клеток противоопухолевых лекарств и снижают их содержание в клетках [6]. ABC-транспортеры используют энергию гидролиза АТР для транспорта субстратов через плазматическую мембрану против градиента их концентрации [7]. В настоящее время идентифицированы 49 членов семейства ABC-транспортеров, которые подразделяются на 7 подсемейств, начиная от ABCA и далее до ABCG. Все ABC-транспортеры содержат два нуклеотид-связывающих и два трансмембранных домена. ABC-транспортеры могут быть топологически классифицированы на основании последовательности нуклеотид-связывающего домена, известного как ABC-домен, который содержит консервативную ABC-последовательность. В ряде исследований было показано, что консервативная ABC-последовательность участвует в оттоке эндогенных молекул и ксенобиотиков из клеток [8]. Кроме того, было обнаружено, что в различных типах раковых клеток, в том числе при раке толстой кишки, печени, почек, поджелудочной железы и других, наблюдается повы-

шенная экспрессия гена *MDR1* [9], которая обеспечивает устойчивость клеток к действию самых различных нейтральных и катионных гидрофобных химиотерапевтических соединений, включая антрациклины, алкалоиды, таксаны, антибиотики и других [10].

Белки, поддерживающие в клетке окислительно-восстановительный (редокс) баланс, белки семейства NADPH-оксидаз (NOX) и первичный продукт их действия в виде активных форм кислорода (АФК) играют важную роль в канцерогенезе [11]. Ранее было показано, что АФК играют важную роль в определении судьбы клеток [12]. При низких концентрациях АФК участвуют в координации различных внутриклеточных сигнальных путей и клеточных ответов. Однако при повышенном уровне АФК индуцируют окислительный стресс и гибель клеток [13]. АФК, как известно, генерируются в ходе различных клеточных процессов в качестве конечного продукта метаболизма. NADPH-оксидаза, по сути, является сложной ферментативной системой, которая образует АФК в качестве основного продукта. NOX катализирует перенос электрона от молекулы NADPH на молекулярный кислород с образованием АФК. Семейство ферментов NOX состоит из семи членов, обозначаемых как NOX-1–NOX-5 и DUOX-1–DUOX-2 [14]. Существование разных изоформ NOX и их распределение среди различных тканей предполагает сложную роль этого семейства ферментов в поддержании редокс-гомеостаза внутри клеток [15]. Дисрегулированная активация и экспрессия NOX-опосредованной генерации АФК значительно способствует прогрессированию опухолевого процесса и метастазированию [16]. Показано, что изоформа NOX (NOX-1) поддерживает пролиферацию клеток и ассоциирована с прогрессированием рака толстой кишки [17]. В предыдущей работе мы показали, что переключение с изоформы NOX-1 на NOX-2 способствует возникновению инвазивных фенотипов клеток рака толстой кишки [18]. Также было показано, что ядерный эритроид-подобный фактор 2 (Nrf-2) является индуцибельным фактором транскрипции, который в основном участвует в транскрипции целого ряда антиоксидантных и цитопротективных генов. Nrf-2 защищает опухолевые клетки от окислительного стресса и способствует поддержанию внутриклеточного редокс-гомеостаза [19]. Однако участие изоформ NOX и Nrf-2 в развитии фенотипа лекарственной устойчивости в клетках рака толстой кишки изучено недостаточно. В настоящем исследовании нами была изучена роль редокс-белков, NOX-2 и Nrf-2, и их реакция на обработку клеток противорако-

вым агентом 5-фторурацилом (5-FU) в фенотипе лекарственной устойчивости клеток рака толстой кишки (HCT-116/R). Кроме того, мы также обнаружили, что ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 вызывает повышение чувствительности клеток HCT-116/R к действию 5-FU. Эти результаты могут свидетельствовать о непосредственном участии редокс-белков NOX-2 и Nrf-2 в регуляции окислительно-восстановительных процессов клетки при развитии лекарственной резистентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Все реактивы для молекулярной биологии были приобретены в коммерческих фирмах. Среда RPMI-1640, физиологический раствор Дульбекко (DPBS), фетальная бычья сыворотка (FBS), краситель 5,6-CFDA, Аннексин-V (Alexa fluor 488), краситель пропидиум йодид (PI), набор для синтеза кДНК, краситель SYBR Green, антитела против Nrf-2, конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антикроличьи и антикозляные антитела («GIBCO», США); набор для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) («Takara Bio Inc.», Япония); нитросиний тетразолий (NBT), 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (H₂DCFDA), ингибитор NOX-1 (ML171), N-[4-[2,3-дигидро-1-(2-метилбензоил)-1H-индол-5-ил]-5-метил-2-тиазолил]-1,3-бензодиоксол-5 ацетамид (ML385), гистамин дигидрохлорид (HDC), тиазолил синий тетразолий бромид (MTT), трипановый синий, антимышинные конъюгированные с HRP антитела («Sigma-Aldrich», США); дифенилен-йодоний (DPI) («APEX BIO», США). Первичные антитела: антитела против NOX-1 (1/1000) и NOX-2 (1/500) («BioRad», США); антитела против MDR1 (1/1000) и β-актина (1/1000) («Cell Signaling Technology», США).

Линии клеток и их культивирование. Линия клеток колоректальной карциномы (HCT-116) поступила от Национального центра клеточной науки (NCCS), Пьюн, Индия. Клетки выращивали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин (2 ммоль/литр). Культуральная среда также содержала 10% фетальной бычьей сыворотки и смесь антибиотиков: пенициллин (5 мг/мл), стрептомицин (5 мг/мл) и неомицин (10 мг/мл) («GIBCO» и «Invitrogen», Великобритания). Клетки выдерживали в увлажненной атмосфере, состоящей из 95% воздуха и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе при 37 °C. В экспериментах использовали культивируемые клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста.

Трансфекция. Трансфекцию генов *MDR1* (pNaMDRwt Addgene Plasmid #10957) и *GFP-Nrf-2* (pcDNA3-EGFP-C4-Nrf-2 Addgene Plasmid #21549) осуществляли с помощью реагента Lipofectamine LTX («Invitrogen», Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки HCT-116 рассеивали в соответствующие культуральные чашки и инкубировали в течение 16 ч. Исползованную среду меняли на свежую. Сначала раствор ДНК и липофектамин готовили в пробирках отдельно, согласно инструкциям производителя, затем их смешивали и инкубировали в течение 8 мин. После этого приготовленной смесью обрызгивали клетки и инкубировали в течение 48 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Клетки HCT-116, повышенно экспрессирующие MDR1, далее обозначали как клетки HCT-116/R.

Обработка 5-фторурацилом. С использованием ДМСО культуральной чистоты приготавливали концентрированный раствор противоракового агента 5-FU (50 мМ). Клетки HCT-116/R инкубировали с различными дозами 5-FU (1, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 и 2000 мкМ) в течение 24 ч. Для определения влияния ингибиторов клетки HCT-116/R инкубировали с 5-FU (100 мкМ) с добавлением ингибиторов или без них в течение 24 ч.

Ингибирование NOX-2 и Nrf-2. Активность ферментов NOX-2 и Nrf-2 подавляли с помощью специфических ингибиторов. С использованием ДМСО культуральной чистоты приготавливали концентрированные растворы ингибитора NOX – DPI (10 мМ), специфического ингибитора NOX-1 – ML171 (0,5 мМ), специфического ингибитора NOX-2 – HDC (5 мМ) и специфического ингибитора Nrf-2 – ML385 (10 мМ). Клетки HCT-116/R обрабатывали DPI (10 мкМ) в течение 2 ч или ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ) в течение 4 ч. Для определения гибели клеток клетки HCT-116/R обрабатывали отдельно 5-FU (100 мкМ) или 5-FU вместе с ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ) в течение 24 ч. Кроме того, клетки HCT-116/R были предварительно обработаны DPI (10 мкМ) в течение 2 ч и затем 5-FU (100 мкМ) в течение 24 ч.

Морфологический анализ. Изменения морфологии клеток HCT-116 при их трансфекции наблюдали с помощью фильтра DIC в ярком поле микроскопа. Вкратце, клетки HCT-116 и HCT-116/R промывали буфером DPBS и наблюдали более 150 клеток в трех разных полях с использованием фильтра DIC (DP-71, IX81, «Olympus», Япония). Изображения клеток получали с помощью программы Image-Pro MC 6.1

(США) и анализировали с помощью программы NIH Image J, США.

Анализ накопления родамина 123. Окрашивание родамином 123 проводили, как описано ранее, с небольшими изменениями [20]. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R промывали DPBS и окрашивали 10 мкМ родамина 123 (в HBSS) в течение 1 ч, и получали изображения с помощью программы Image-Pro MC 6.1 (США) на инвертированном флуоресцентном микроскопе (DP-71, IX81, «Olympus», Япония). Изображения анализировали с помощью программы NIH Image J (США).

Анализ распределения и накопления доксорубина внутри клеток. Внутриклеточное распределение и накопление доксорубина определяли, как сообщалось ранее [21]. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R отмывали буфером DPBS, обрабатывали 5 мкМ доксорубина в течение 2 ч, и наблюдали за ними с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Определение АФК внутри клеток. За образованием АФК внутри клеток наблюдали с помощью красителя H_2DCFDA . Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R инкубировали с H_2DCFDA (25 мкМ) в темноте в течение 20 мин при 37 °С. Планшет подвергали мониторингу величины флуоресценции молекул DCF при возбуждении 485 нм и излучении 525 нм с использованием ридера микропланшет (multimode microplate reader, «Molecular Devices», США). Для качественного анализа внутриклеточных АФК клетки НСТ-116 и НСТ-116/R инкубировали с H_2DCFDA (25 мкМ) в течение 20 мин при 37 °С в темноте. После этого клетки промывали DPBS, а изображения получали с помощью программного обеспечения Image-Pro MC 6.1 (США) под инвертированным флуоресцентным микроскопом (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Определение активности NADPH-оксидазы с красителем нитросиний тетразолий. Активность NOX определяли с помощью метода с использованием красителя NBT, как описано ранее [22]. Принцип этого метода основан на восстановлении NBT до формазана NOX-зависимым супероксидом. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R инкубировали с 100 мкл раствора NBT (1 мг/мл в среде RPMI-1640) при 37 °С в течение 1 ч. Затем клетки разрушали с помощью 100 мкл ДМСО, и регистрировали поглощение при 570 нм. Результаты представляли в виде среднего значения процента поглощения в различных группах.

Определение значения IC_{50} и анализ клеточной пролиферации. Значение полумаксимальной

ингибирующей концентрации (IC_{50}) 5-FU на клетки НСТ-116 и НСТ-116/R определяли с помощью красителя МТТ, как описано ранее [23]. Вкратце, клетки НСТ-116 и НСТ-116/R обрабатывали различными концентрациями (1, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 и 2000 мкМ) 5-FU в течение 24 ч. Затем клетки инкубировали с 0,5 мг/мл раствора МТТ в течение 4 ч при 37 °С. После этого в каждую лунку добавляли 0,1 мл смеси SDS и HCl (10% SDS в 0,01 М HCl), тщательно перемешивали и инкубировали в темноте в течение 20 мин при 37 °С. Поглощение регистрировали в каждой лунке при 570 нм с референсной длиной волны при 650 нм с использованием ридера микропланшет (multimode microplate reader SpectraMax M2^e, «Molecular Devices», США). Влияние 5-FU или ингибиторов на пролиферацию клеток НСТ-116 и НСТ-116/R оценивали с помощью МТТ. Результаты представлены в виде процента значения клеточной пролиферации в различных группах.

Определение гибели клеток. Оценку процесса гибели клеток проводили с помощью метода исключения красителя трипановый синий, как описано ранее [24]. Вкратце, клетки НСТ-116/R обрабатывали, как было описано ранее. После завершения инкубации клетки собирали и промывали один раз буфером DPBS. Затем равные количества суспензии клеток смешивали с трипановым синим, после чего подсчитывали количество живых и мертвых клеток в ярком поле микроскопа, и определяли процент погибших клеток, используя формулу (процент гибели клеток = (число мертвых клеток/общее количество клеток) × 100).

Определение ЛДГ. Цитотоксичный эффект 5-FU и ингибиторов оценивали с помощью набора для определения активности ЛДГ, согласно рекомендациям производителя. Вкратце, $1,5 \times 10^4$ клеток НСТ-116/R обрабатывали либо 5-FU (100 мкМ) в отдельности или 5-FU (100 мкМ) с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). После этого собирали остаточную среду, смешивали с реакционной смесью, содержащей ЛДГ и раствор красителя, и инкубировали в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Регистрировали оптическое поглощение при 490 нм с референсной длиной волны при 650 нм с использованием ридера микропланшет (multimode microplate reader, SpectraMax M2^e, «Molecular Devices», США). Результаты представлены в виде процента цитотоксичности (высвобождение ЛДГ).

Окрашивание клеток Аннексином-V и пропидиум иодидом (PI). Оценку гибели клеток в результате апоптоза проводили по методу окраши-

вания клеток Аннексином-V/PI, как описано ранее [24]. Вкратце, клетки НСТ-116/R выращивали на покрытых поли-L-лизинном покровных стеклах и обрабатывали их, как описано ранее. Затем клетки окрашивали реагентом Аннексин-V (Alexa Fluor 488) в течение 20 мин с последующим окрашиванием PI в течение 5 мин и наблюдали за более чем 150 клетками в трех случайных полях с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Анализ жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток анализировали методом окрашивания CFDA. Вкратце, клетки НСТ-116/R обрабатывали только 5-FU (100 мкМ) или 5-FU (100 мкМ) вместе с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). Затем клетки окрашивали красителем CFDA (25 мкМ) в течение 20 мин и дважды промывали буфером DPBS. Окрашенные клетки анализировали с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP71, IX81, «Olympus», Япония).

Транслокация Nrf-2. Транслокацию GFP-Nrf-2 между ядром и цитоплазмой оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Вкратце, 4×10^4 клеток трансфицировали плазмидой с геном *MDR1*. Спустя 24 ч клетки трансфицировали *GFP-Nrf-2* и инкубировали в течение 24 ч, используя реагент Lipofectamine LTX с Plus-реагентом. После этого клетки отмывали DPBS и получали изображения с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (DP-71, IX81, «Olympus», Япония).

Вестерн-блоттинг. Экспрессию белков *MDR1*, HIF-1 α , Nrf-2, NOX-1, NOX-2 и β -актина оценивали с помощью метода вестерн-блоттинга. Вкратце, 1×10^6 клеток трансфицировали плазмидой с геном *MDR1* в течение 48 ч. Через различные интервалы времени собирали клетки, их дважды промывали охлажденным до температуры льда буфером DPBS, лизировали в лизисном буфере (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 150 мМ CaCl₂, 1 мМ Na-ванадат, 0,05% Nonident P-40, набор ингибиторов протеаз) и помещали в лед на 30 мин. Затем клетки разрушали и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин при 4 °С. Супернатант собирали как лизат целых клеток. Концентрацию белка определяли с помощью BCA-набора для определения концентрации белка. Белки (50 мкг) разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном и 10%-ном SDS-PAGE геле, затем переносили на мембрану PVDF с помощью метода влажного электропереноса при 4 °С. Мембрану блокировали 3%-ным обезжиренным молоком в буфере TBST в течение

2 ч при комнатной температуре с последующей ночной инкубацией мембраны с первичными антителами при 4 °С. Затем мембрану обрабатывали вторичными антителами (1/3000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Белки визуализировали с помощью хемолюминесценции (EZ-ECL), согласно инструкциям производителя в темноте с использованием синей пленки «Kodak X-Omat blue film» («Kodak», США).

Экстракция РНК и ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Суммарную РНК экстрагировали с использованием реагента Trizol («Invitrogen», США) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, осуществляли обратную транскрипцию 1 мкг общей РНК в кДНК с использованием набора для синтеза кДНК («Invitrogen», США). RT-qPCR проводили с использованием 96-луночного планшета MicroAmp fast optical 96-well PCR plates («Applied Biosystems», США) на приборе Step One plus real-time PCR detection system («Applied Biosystems», США). Реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей кДНК (100 пмоль), SYBR Green master-mix (1 мкМ), каждый праймер и свободную от протеаз воду. В качестве эндогенного контроля использовали 18S рРНК, и уровни экспрессии мРНК для NOX-1, NOX-2 и HO-1 нормализовали относительно 18S рРНК. Используемые в работе праймеры приведены в таблице.

Статистическая обработка данных. Полученные данные были проанализированы с помощью *t*-критерия Стьюдента и метода ANOVA (односторонний дисперсионный анализ), а затем с помощью критерия Стьюдента–Ньюмана–Кеуласса (SNK – тест по параметрическим переменным) для проведения множественных сравнений с использованием программы Sigma plot 12.0 statistical analysis software. Значения * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ рассматривались как статистически достоверные.

Перечень праймеров, использованных в данной работе

Название праймера	Последовательность праймера (5'–3')
NOX-1 F	GAGACAGGTGCCTTTTCCTG
NOX-1 R	CGGTGAGGAAGAGACGGTAG
NOX-2 F	CACATGCCCTTTGAGTGTTTG
NOX-2 R	GCCAGTGAGGTAGATGTTGTAG
HO-1 F	AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC
HO-1 R	AAAGCCCTACAGCAACTGTCCG
18s rRNA F	AGAAACGGCTACCACATCCAA
18s rRNA R	TGTCACCTACCTCCCCGTGTCA

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный праймер.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повышение экспрессии *MDR1* вызывает индукцию фенотипов лекарственной резистентности в клетках НСТ-116. В настоящей работе мы исследовали последствия повышенной экспрессии гена *MDR1* в клетках НСТ-116. Мы трансфицировали ген *MDR1* в клетки НСТ-116, и с помощью микроскопа проанализировали лекарственно-резистентные фенотипы. Мы обнаружили, что в клетках с повышенной экспрессией *MDR1* (НСТ-116/R) наблюдается образование внутриклеточных вакуолей в сравнении с клетками дикого типа (НСТ-116) (рис. 1, *a*). Затем мы проанализировали способность клеток НСТ-116/R снижать поглощение лекарств с помощью окрашивания родамином 123. Мы обнаружили, что в большинстве клеток НСТ-116 наблюдалась интенсивная флуоресценция родамина 123, в то время как клетки НСТ-116/R отличались слабой флуоресценцией. Это означает, что клетки с повышенной экспрессией *MDR1* в меньшей степени поглощают родамин 123 (рис. 1, *b*). Далее мы проанализировали внутриклеточное распределение и накопление доксорубина в обоих типах клеточных линий и обнаружили, что большинство клеток НСТ-116 демонстрировали заметную флуоресценцию доксорубина в ядре. Однако клетки НСТ-116/R не проявляли флуоресценции доксорубина в ядре и уменьшали флуоресценцию доксорубина в своей цитоплазме (рис. 1, *c*). Мы также получили подтверждение повышенной экспрессии *MDR1* с помощью иммуноблоттинга. Полученные нами результаты свидетельствовали о повышенной экспрессии *MDR1* в клетках НСТ-116/R по сравнению с клетками НСТ-116 (рис. 1, *d*). Кроме того, полученные нами результаты показывали значительное повышение экспрессии HIF-1 α и Nrf-2. Этот результат позволил предположить, что повышение экспрессии *MDR1*, HIF-1 α и Nrf-2 связано с возникновением резистентности клеток к действию лекарств. Кроме того, мы также определили чувствительность клеток НСТ-116 и НСТ-116/R к действию 5-фторурацила. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации IC₅₀ для 5-FU в отношении клеток НСТ-116 и НСТ-116/R оказались равными ~241,40 и ~702,30 мкМ соответственно (рис. 1, *e*), что свидетельствовало о большей устойчивости клеток НСТ-116/R к действию 5-фторурацила. Таким образом, эти результаты означают, что повышение экспрессии *MDR1* способствует возникновению резистентных фенотипов клеток колоректальной карциномы человека (НСТ-116).

Повышение экспрессии мРНК для Nrf-2 и HO-1 связано с возникновением лекарственной резистентности клеток НСТ-116/R. Nrf-2 в основном ассоциирован с антиоксидантным ответом и детоксикацией клеток в результате регуляции различных генов-мишеней ARE [25]. В развитии лекарственной резистентности клеток при различных типах рака участвует сигнальная цепь Nrf-2/HO-1 [26]. Чтобы понять действительно ли сигнальная цепь Nrf-2/HO-1 задействована в клетках НСТ-116/R, мы проанализировали экспрессию и активацию фактора транскрипции Nrf-2. Мы обнаружили заметное повышение экспрессии Nrf-2 в клетках НСТ-116/R (рис. 1, *d*). Далее мы попытались исследовать активность Nrf-2, регистрируя транслокацию GFP-Nrf-2 в клетках НСТ-116/R. Мы обнаружили значительную экспрессию GFP-Nrf-2 в ядрах клеток НСТ-116/R (рис. 2, *a*). Однако накопление GFP-Nrf-2 также наблюдалось в цитоплазме клеток НСТ-116. Чтобы определить активность Nrf-2 в ядре, мы проанализировали экспрессию гена-мишени Nrf-2 (гена *HO-1*) на уровне мРНК. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в клетках НСТ-116/R по сравнению с клетками НСТ-116 наблюдается повышенная экспрессия мРНК *HO-1* (рис. 2, *b*). Более того, обработка клеток НСТ-116/R препаратом ML385 (специфическим ингибитором Nrf-2) вызывала значительное снижение уровня активации Nrf-2 и экспрессии мРНК *HO-1* (рис. 2, *a* и *b*). В целом эти результаты свидетельствуют о том, что активация Nrf-2 и продукта нижележащего гена *HO-1* ассоциированы с развитием у клеток НСТ-116/R устойчивости к действию лекарств.

Повышение активности NOX и экспрессии NOX-2 приводит к увеличению образования АФК и способствует развитию устойчивости раковых клеток к действию лекарств. Известно, что активные формы кислорода вносят вклад в возникновение окислительного стресса и прогрессирование рака [27]. Ферменты семейства NOX являются одними из основных источников АФК внутри клетки [28]. В настоящем исследовании нам было интересно изучить участие NOX-опосредованной генерации АФК, связанной с лекарственной устойчивостью, при раке. Сначала мы изучили активность NOX в клетках НСТ-116 и НСТ-116/R. Полученные нами результаты показали существенное увеличение активности NOX в клетках НСТ-116/R по сравнению с клетками НСТ-116 (рис. 3, *a*). Этот результат поставил вопрос о том, коррелирует ли повышенная активность NOX с экспрессией его изоформ NOX-1 и NOX-2. Мы изучили экспрессию NOX-1 и NOX-2 на уровне мРНК и белка и обнаружи-

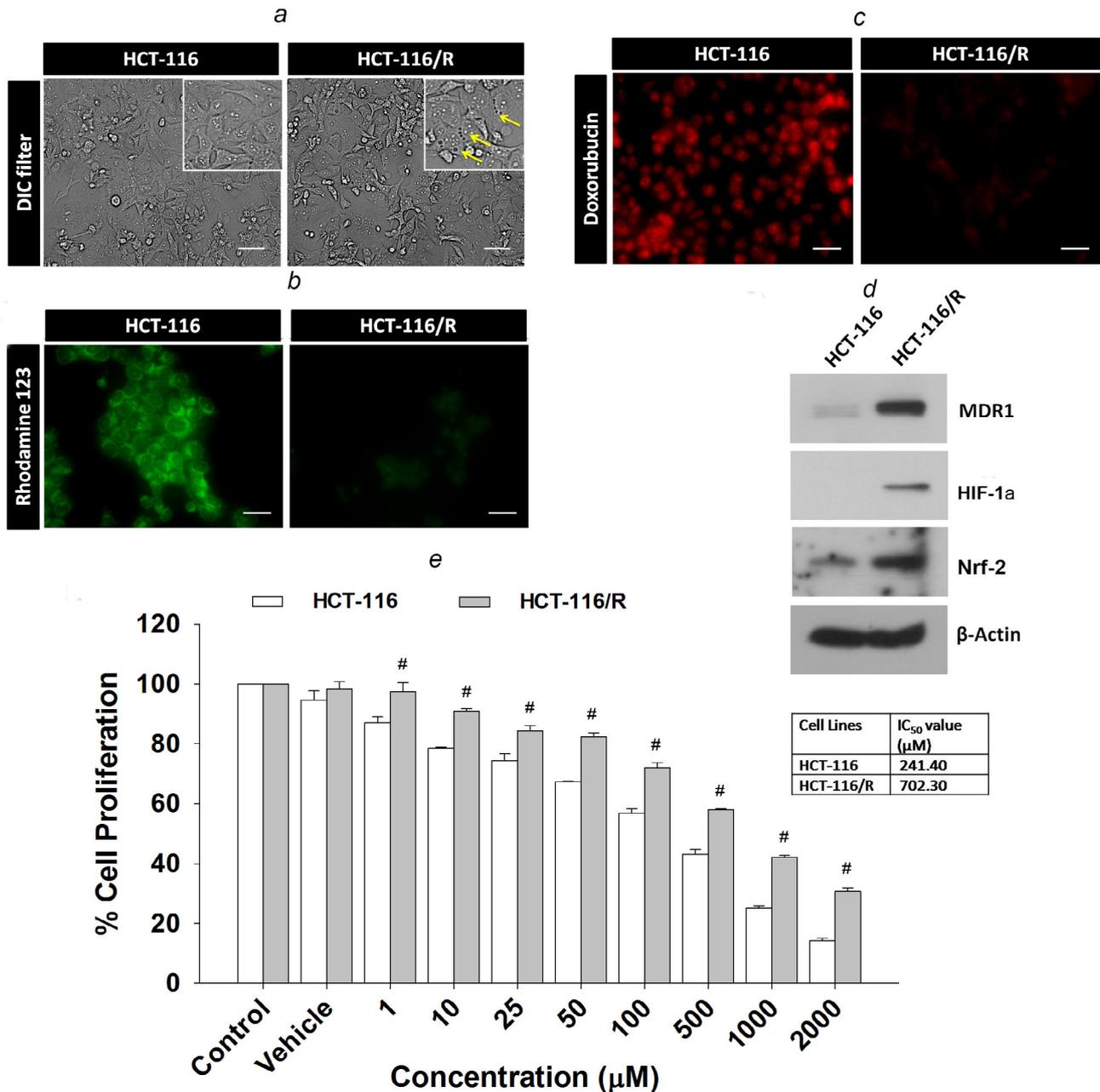


Рис. 1. Характеристика устойчивых к действию лекарств клеток HCT-116/R рака толстой кишки человека. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1*, и были обнаружены различные свойства лекарственной устойчивости. *a* – Морфологический анализ с использованием фильтра DIC. *b* – Окрашивание клеток родамином 123 и их анализ с помощью флуоресцентного микроскопа. *c* – Распределение и накопление доксорубина внутри клеток было проанализировано с помощью флуоресцентного микроскопа. Масштабная линейка – 20 мкм. *d* – Вестерн-блоттинг *MDR1*, *HIF-1α* и *Nrf-2*. В качестве контроля белковой нагрузки использовали β -актин. *e* – Влияние 5-FU (1, 10, 25, 50 мкМ, 100, 500, 1000 и 2000 мкМ) на пролиферацию клеток HCT-116 и HCT-116/R, определенное с помощью МТТ-анализа. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как $\#p \leq 0,001$ между клетками HCT-116 и HCT-116/R (односторонний ANOVA и затем критерий SNK). (С цветными вариантами рис. 1–8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

ли, что уровень NOX-2 был резко повышен в клетках HCT-116/R (рис. 3, *b–d*). Однако экспрессия NOX-1 оставалась на прежнем уровне, что предполагает, что участие фермента NOX

в возникновении резистентности к лекарствам клеток рака толстой кишки у человека зависит от его изоформы (рис. 3, *b* и *c*). Кроме того, мы наблюдали за уровнем внутриклеточных АФК в

клетках HCT-116/R, используя флуоресцентный краситель H₂DCFDA, и обнаружили значительное повышение уровня АФК внутри клеток (рис. 3, *e*). Анализ с использованием микроскопа также подтвердил повышенный внутриклеточный уровень АФК в клетках HCT-116/R (рис. 3, *f* и *g*). Кроме того, чтобы подтвердить роль какой-либо конкретной изоформы NOX, мы обработали устойчивые к действию лекарств клетки HCT-116/R специфичными ингибиторами: DPI (ингибитор NOX), ML171 (специфичный ингибитор NOX-1), HDC (специфичный ингибитор NOX-2) и ML385 (ингибитор Nrf-2). DPI и HDC ингибировали активность NOX и образование АФК в клетках HCT-116/R в сравнении с контрольными клетками HCT-116/R. Однако ML171 и ML385 в незначительной степени ингибировали активацию NOX и образование АФК в устойчивых к действию лекарств клетках HCT-116/R (рис. 4, *a* и *b*). Таким образом, полученные нами результаты поз-

воляют предположить, что активация ферментов NOX и повышение экспрессии NOX-2 облегчает образование АФК при резистентности к действию лекарств клеток HCT-116/R.

Ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 способствует устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-FU и сенсibiliзирует клетки HCT-116/R к гибели. 5-фторурацил является антимиетаболитом, который препятствует синтезу ДНК и РНК раковых клеток [29]. Он широко используется для лечения различных типов рака, включая рак молочной железы, головы и шеи и рак толстой кишки [30, 31]. В настоящее время при лечении рака толстой кишки в основном используется 5-FU в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами, и это приводит к существенному улучшению ситуации с выживаемостью больных [32]. Однако возникновение лекарственной резистентности ограничивает активность 5-FU. После того, как было обнаружено повышение экспрессии и активации

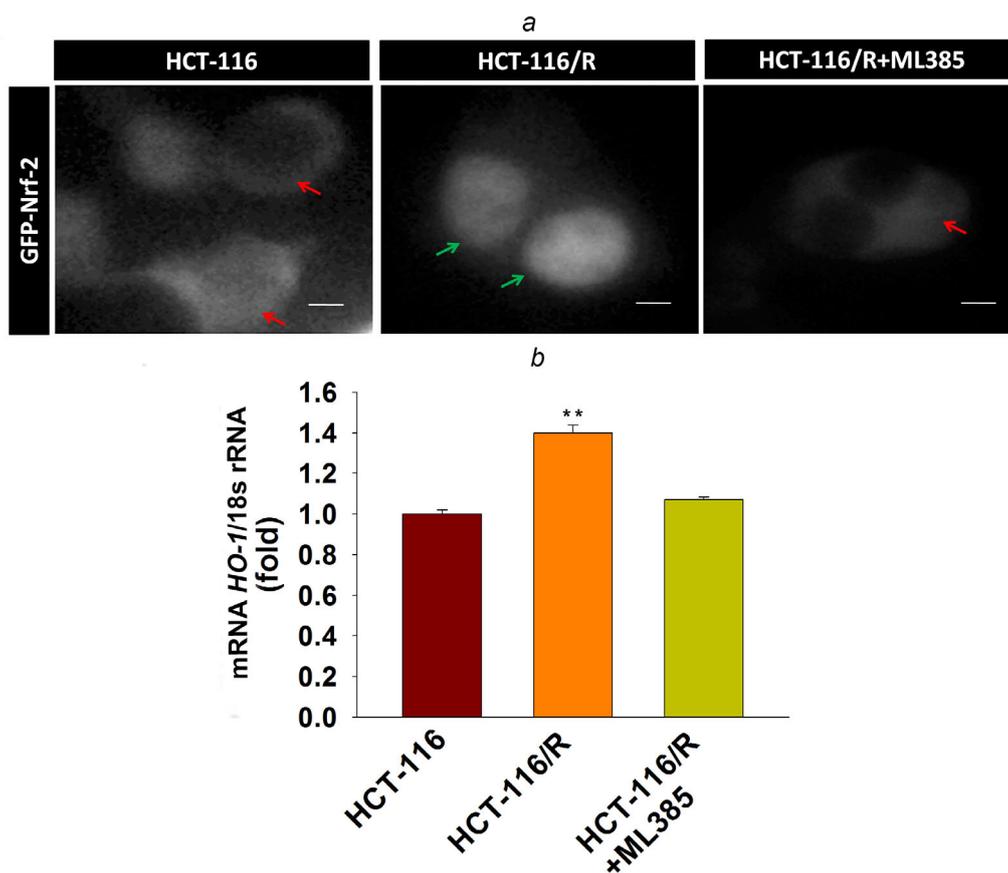


Рис. 2. Активация Nrf-2-зависимого сигнального пути в устойчивых к действию лекарств клетках HCT-116/R рака толстой кишки. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1* с последующей обработкой ML385. При этом наблюдалась активация и накопление Nrf-2. *a* – Изучение транслокации GFP-Nrf-2. Зелеными стрелками показано накопление GFP-Nrf-2 в ядре, и красными стрелками обозначено накопление GFP-Nrf-2 в цитоплазме. Масштабная линейка – 5 мкм. *b* – Анализ *HO-1* с помощью RT-qPCR. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Достоверные различия определены при $**p \leq 0,01$ между клетками HCT-116 и HCT-116/R (*t*-критерий)

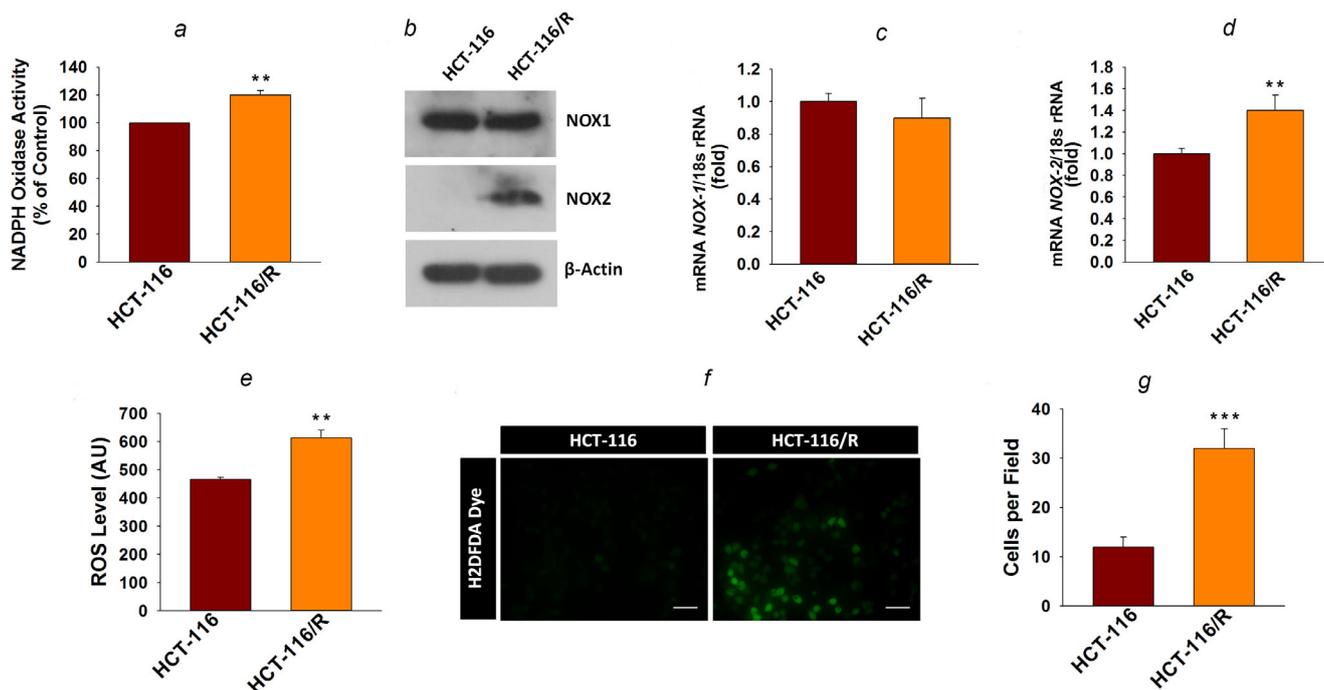


Рис. 3. Активация ферментов семейства NOX и образование АФК в клетках линии HCT-116/R, устойчивых к действию лекарств. Клетки HCT-116 трансфицировали геном *MDR1* и регистрировали активацию и экспрессию ферментов NOX. *a* – Анализ активности NOX с помощью NBT-анализа. *b* – Вестерн-блоттинг белков NOX-1 и NOX-2. В качестве контроля белковой нагрузки использовали β -актин. RT-qPCR анализ *NOX-1* (*c*) и *NOX-2* (*d*). Уровень внутриклеточной генерации АФК определяли с помощью красителя H2DCFDA. *e* – Количественный анализ с использованием спектрофотометра. *f* и *g* – Количественный анализ с использованием флуоресцентного микроскопа. Масштабная линейка – 50 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ между клетками HCT-116 и HCT-116/R (*t*-критерий)

NOX-2 и Nrf-2 в клетках HCT-116/R, мы поставили цель изучить роль активации NOX-2 и Nrf-2 в возникновении устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила. Для этого мы обработали клетки HCT-116/R 5-FU в отдельности и 5-FU вместе с ингибитором NOX (DPI) и ингибитором Nrf-2 (ML385). Оказалось, что обработка клеток HCT-116/R 5-FU вместе с DPI и ML385 вызывает значительное ингибирование клеточной пролиферации и индуцирует гибель клеток по сравнению с их обработкой только 5-FU. Этот результат предполагает роль активации NOX и Nrf-2 в развитии у клеток устойчивости к действию 5-FU (рис. 5, *a* и *b*).

Чтобы выяснить роль отдельных изоформ NOX, мы обработали клетки HCT-116/R 5-FU вместе с ML171 (специфичный ингибитор NOX-1) и HDC (специфичный ингибитор NOX-2). Интересно, что обработка клеток HCT-116/R 5-FU вместе с HDC приводила к ингибированию пролиферации клеток и индуцировала гибель клеток в сравнении с обработкой клеток только 5-FU (рис. 5, *a* и *b*). Однако обработка этих клеток 5-FU вместе с ML171 не оказывала заметного влияния на клеточную пролиферацию

и гибель клеток в сравнении с их обработкой только 5-FU (рис. 5, *a* и *b*). Эти результаты позволяют предположить, что ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 усиливает 5-FU-опосредованную гибель клеток HCT-116/R. Далее мы провели мониторинг высвобождения из клеток ЛДГ, чтобы оценить гибель клеток в результате некроза во всех группах клеток, но не смогли обнаружить значительного высвобождения ЛДГ при обработке клеток. Эти результаты позволяют предположить, что обработка 5-FU или 5-FU вместе с ингибиторами не вызывает некротическую гибель клеток (рис. 5, *c*). Также мы изучили морфологические изменения и жизнеспособность клеток после различных обработок и обнаружили, что обработка клеток 5-FU вместе с DPI, HDC и ML385 заметно изменила клеточную морфологию и снизила жизнеспособность клеток HCT-116/R (рис. 6, *a–c*). В то же время обработка клеток HCT-116/R 5-FU вместе с ML171 не показала каких-либо существенных изменений в клеточной морфологии и жизнеспособности клеток по сравнению с обработкой только 5-FU. Этот результат позволяет предположить, что ингибирование активности

NOX-2 и Nrf-2 снижает жизнеспособность клеток HCT-116/R (рис. 6, *a–c*).

Чтобы изучить характер гибели клеток в результате их обработки, мы окрасили клетки Аннексином-V и PI. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что обработка клеток 5-FU с DPI, HDC и ML385 приводит к наибольшему числу Аннексин-V/PI-положительных клеток HCT-116/R по сравнению с клетками, обработанными 5-FU вместе с ML171 или только 5-FU (рис. 7, *a* и *b*). Этот результат говорит о том, что ингибирование активности NOX-2 и Nrf-2 способствует 5-FU-опосредованному апоптозу клеток HCT-116/R. Следовательно, полученные нами результаты позволяют предположить, что активация NOX-2 и Nrf-2 приводит к резистентности клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лекарственная резистентность — это явление, которое возникает при патологических состояниях клеток, приобретающих устойчивость к действию терапевтических агентов. Приобретение раковыми клетками устойчивости к действию лекарств является серьезным препятствием на пути успешного лечения рака. Хотя многие типы рака изначально чувствительны к химиотерапевтическим препаратам, со временем раковые клетки становятся резистентными к их действию благодаря влиянию многочисленных внутренних и внешних факторов [5]. Один из наиболее хорошо изученных механизмов лекарственной резистентности заключается в экспрессии белков семейства АТФ-связывающего кассетного транспортера. Три транспортера: белок множественной лекарственной устойчивости 1 (MDR1), ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью белок 1 (MRP1) и белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP) участвуют в процессе лекарственной резистентности при различных типах рака [33]. Все эти транспортеры защищают раковые клетки от различных химиотерапевтических агентов. Белок MDR1 (P-гр, P-гликопротеин) был первым идентифицированным и широко изученным транспортным белком в различных моделях рака. Недавно были получены убедительные доказательства, показавшие, что сверхэкспрессия P-гр связана с развитием множественной лекарственной устойчивости (MDR) при раке. Таким образом, клетки, которые повышенно экспрессируют P-гр, проявляют перекрестную резистентность к множественным цитотоксическим препаратам и способ-

ствуют развитию множественной лекарственной устойчивости в раковых клетках. Развитие лекарственной устойчивости при раке толстой кишки является основным феноменом, ответственным за рецидив опухоли и снижение выживаемости пациентов [34]. Поэтому выявление новых регуляторов резистентности рака толстой кишки крайне необходимо.

Есть неопровержимые доказательства того, что нарушение регуляции редокс-белков и генов способствует устойчивости раковых клеток к действию лекарств [35]. Известно, что АФК нацелены на редокс-чувствительные белки и регулируют иммунный ответ, пролиферацию клеток, дифференцировку клеток и сигнализацию о гибели клеток. Внутриклеточные АФК в основном вырабатываются ферментами семейства NADPH-оксидаз в качестве основного продукта и участвуют в окислительно-восстановительном

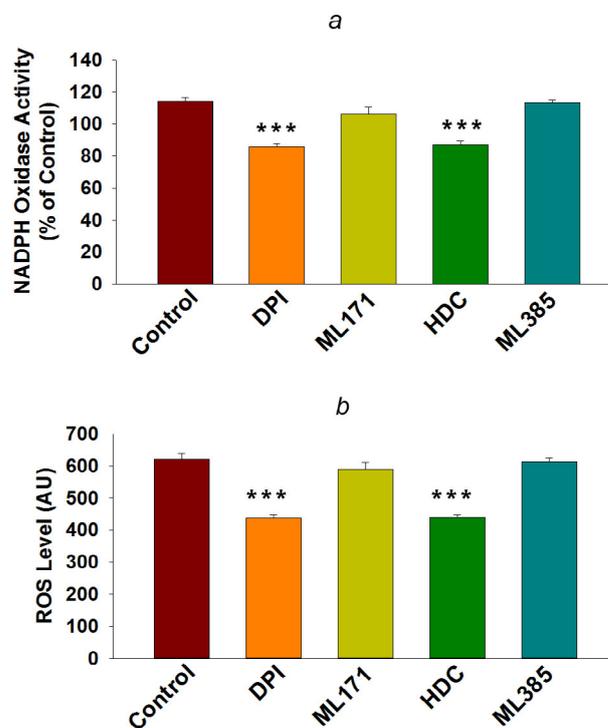


Рис. 4. NOX-2-опосредованное образование АФК в клетках HCT-116/R рака толстой кишки, устойчивых к действию лекарств. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1* и обработаны DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). В этих клетках регистрировали активацию белков NOX. *a* — Определение активности белков NOX с помощью NBT. *b* — Определение АФК с помощью спектрофотометра. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как *** $p \leq 0,001$ между необработанными и обработанными клетками (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

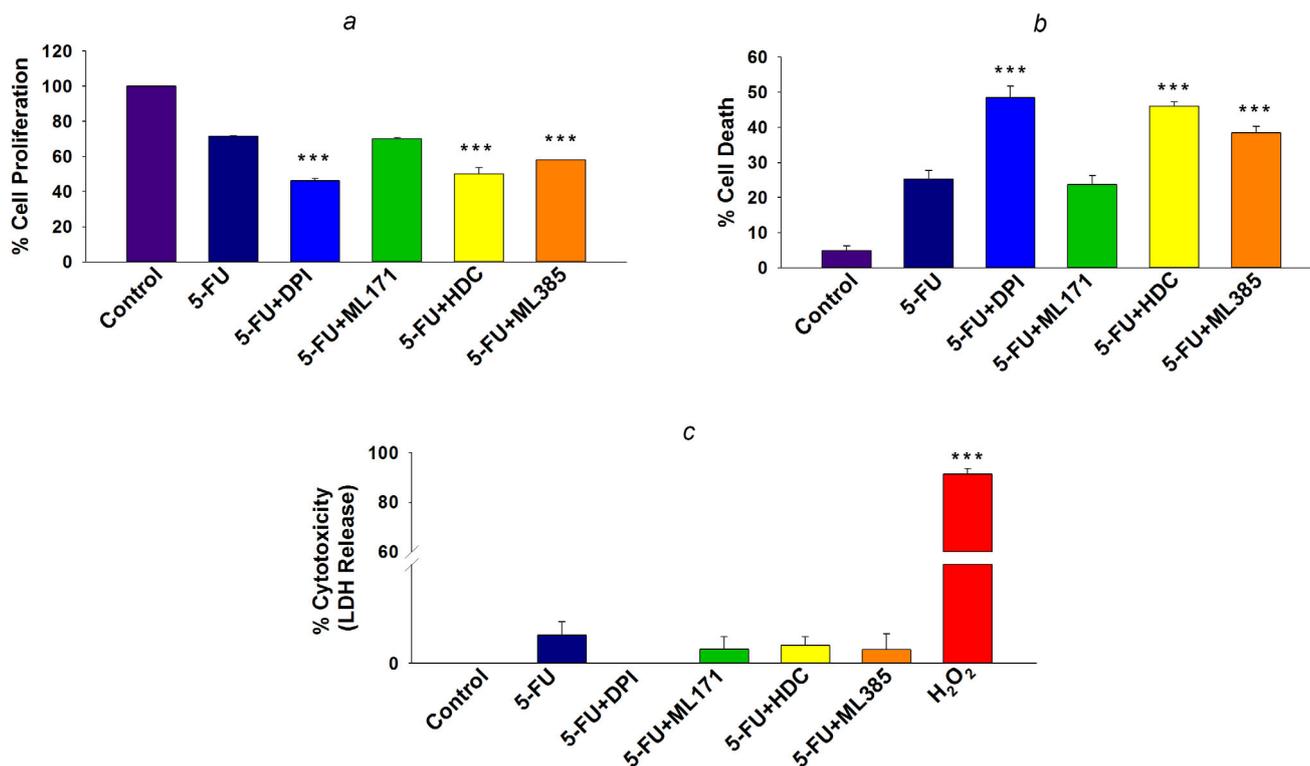


Рис. 5. Ингибирование активности NOX-2 способствует гибели клеток HCT-116/R рака толстой кишки человека, устойчивых к действию лекарств. Клетки HCT-116 были трансфицированы геном *MDR1* и обработаны либо 5-FU (100 мкМ) в отдельности или 5-FU (100 мкМ) с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). *a* – Анализ пролиферации клеток с помощью МТТ-анализа. *b* – Анализ гибели клеток с помощью трипанового синего. *c* – Определение высвобождения ЛДГ из клеток с помощью набора для определения ЛДГ. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как *** $p \leq 0,001$ между обработкой клеток только 5-FU и обработкой клеток 5-FU вместе с DPI, ML171, HDC и ML385 (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

гомеостазе клеток. Очевидно, что АФК, образуемые белками NOX, участвуют в развитии и прогрессировании различных типов рака [36]. В предыдущей работе было высказано предположение, что переключение экспрессии с NOX-1 на NOX-2 ассоциировано со злокачественной трансформацией клеток [18]. Действительно, было показано, что различные онкогены, включая RAS, регулируют экспрессию и активацию белка NOX-1 [37]. В отличие от NOX-1, другая изоформа, NOX-2, принимает участие в развитии инвазивных фенотипов клеток рака толстой кишки [18]. NOX-2 является первой изоформой NOX, для которой была показана преимущественная экспрессия в иммунных клетках, включая макрофаги, моноциты и нейтрофилы [38]. Недавно было показано, что переключение с изоформы NOX-1 на NOX-2 способствует развитию инвазивного фенотипа у клеток рака толстой кишки [18]. В целом эти данные позволяют предположить, что как NOX-1, так и NOX-2 участвуют в прогрессировании рака толстой кишки.

Nrf-2 является основным фактором транскрипции, который способствует транскрипции целого ряда антиоксидантных генов. При физиологических условиях белок Nrf-2 подвергается постоянной деградации протеазой Keap-1. В условиях окислительного стресса Nrf-2 высвобождается из комплекса с Keap-1 и активируется. При активации происходит его транслокация в ядро, где он инициирует транскрипцию генов *ARE* [39]. В предыдущей работе было сделано предположение, что мутации в Nrf-2 и Keap-1 при различных типах рака человека приводят к конститутивной активации Nrf-2 и экспрессии цитопротективных (способствующих выживанию) генов и в конечном итоге способствуют лекарственной устойчивости при раке [40].

Ранее было предположено, что активация ферментов NOX и Nrf-2 ассоциирована с поддержанием гомеостаза клеток [41]. Мутация в белке RAS усиливает экспрессию и активацию NOX и образования АФК в клетках рака толстой кишки [42, 43]. Чтобы сохранить окислительно-восстановительный баланс внутри клетки, му-

тированный белок RAS также способствует активации Nrf-2 [44]. Известно, что Nrf-2 участвует в регуляции образования АФК, опосредованной ферментами NOX [45]. Было также предположено, что активация NOX тесно связана с антиоксидантами, регулируемыми микроокружением опухоли [46]. Кроме того, во время прогрессирования различных типов рака происходит активация пути Nrf-2/HO-1, который активируется во время прогрессирования различных злокачественных новообразований, а также ассоциируется с химиорезистентностью и плохим прогнозом [26]. Была показана роль изоформ NOX в прогрессировании инвазии и росте опухоли. Однако их императивная роль в развитии лекарственной устойчивости клеток рака толстой кишки остается невыясненной.

В этом исследовании нам было интересно изучить роль Nrf-2 в развитии лекарственной устойчивости. Мы проверили, происходит ли активация Nrf-2 в резистентных клетках НСТ-

116/R или нет. В результате мы обнаружили, что в клетках НСТ-116/R наблюдается повышение экспрессии Nrf-2. Затем мы провели мониторинг активации Nrf-2-зависимого сигнального пути на основе его локализации и экспрессии его гена-мишени, *HO-1*. Мы обнаружили заметное накопление GFP-Nrf-2 в ядре и повышение экспрессии *HO-1* в клетках НСТ-116/R. Эти результаты позволяют предположить, что Nrf-2 не только стабилизируется в связи с повышенной генерацией АФК, но он также активируется и участвует в транскрипции генов-мишеней в клетках НСТ-116/R.

Внутриклеточный уровень АФК ассоциирован с различными событиями, происходящими внутри раковых клеток [27]. Все больше работ свидетельствуют о возможной связи между уровнем АФК внутри клеток и их устойчивостью к действию химических соединений [47]. В процессе образования АФК основное участие принимают ферменты семейства NOX. Поэтому

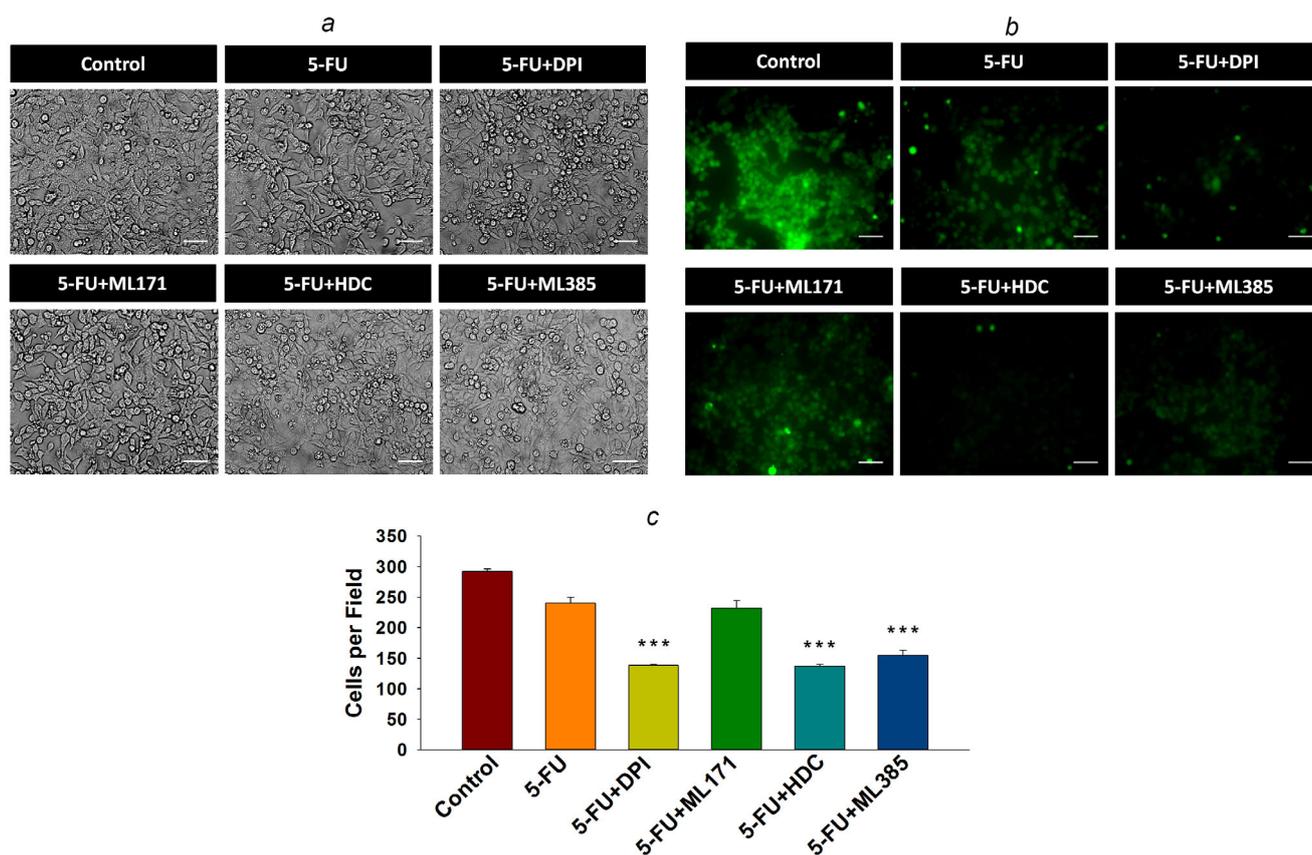


Рис. 6. Ингибирование процесса активации NOX-2 способствует апоптотической гибели клеток НСТ-116/R рака толстой кишки человека, устойчивых к действию лекарств. Клетки НСТ-116/R были обработаны только 5-FU (100 мкМ) или 5-FU (100 мкМ) вместе с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) и ML385 (10 мкМ). *a* – Анализ морфологии клеток с использованием фильтра DIC. *b* и *c* – Анализ жизнеспособности клеток с помощью окрашивания красителем CFDA и использования флуоресцентного микроскопа. Масштабная линейка – 50 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как *** $p \leq 0,001$ между клетками, обработанными только 5-FU, и клетками, обработанными 5-FU вместе с DPI, ML171, HDC и ML385 (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

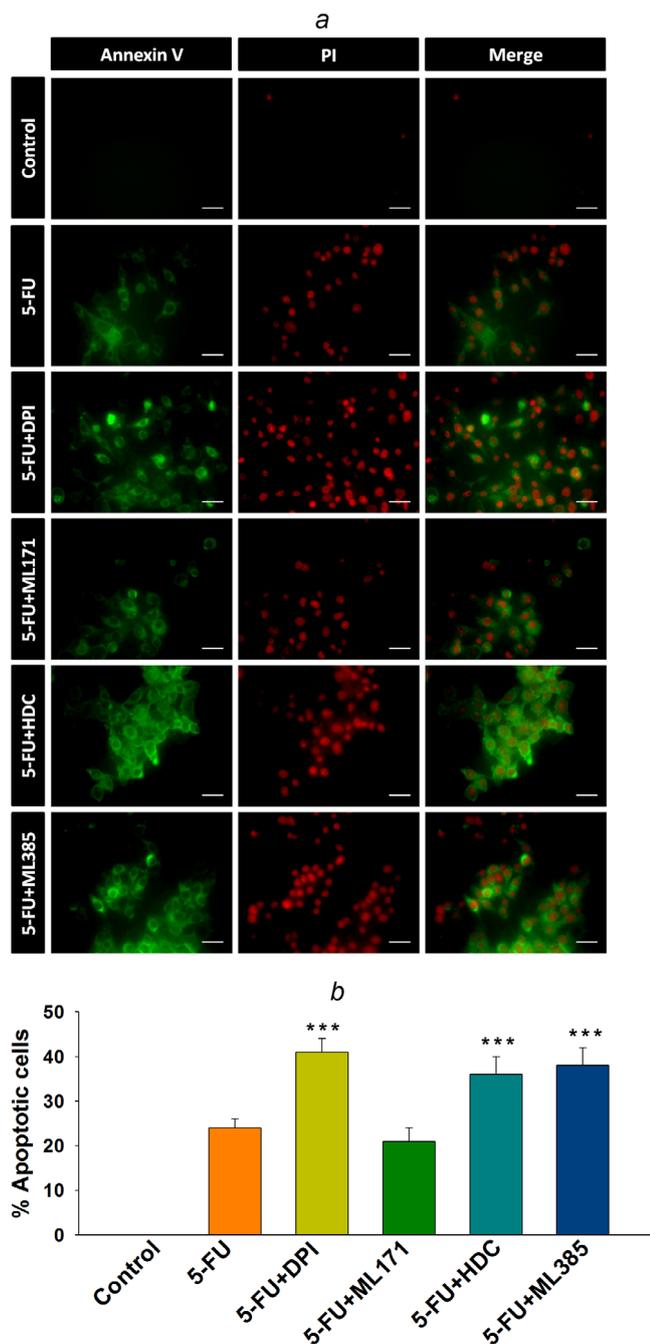


Рис. 7. Ингибирование процесса активации NOX-2 и Nrf-2 способствует гибели раковых клеток HCT-116/R в результате апоптоза. Клетки HCT-116/R были обработаны только 5-FU (100 мкМ) или же 5-FU (100 мкМ) вместе с DPI (10 мкМ), ML171 (0,5 мкМ), HDC (10 мкМ) или ML385 (10 мкМ). *a* и *b* – Анализ гибели клеток от апоптоза с помощью окрашивания Аннексином-V и PI и наблюдения клеток под флуоресцентным микроскопом. Масштабная линейка – 20 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) трех независимых экспериментов. Статистически достоверные различия обозначены как $***p \leq 0,001$ между клетками, обработанными только 5-FU, и клетками, обработанными 5-FU вместе с DPI, ML171, HDC и ML385 (использованы метод одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и затем критерий SNK)

мы изучили возможную связь между активацией ферментов NOX и прогрессированием резистентных фенотипов. Нами было обнаружено, что в клетках HCT-116/R повышена активация NOX и усилена генерация АФК. Далее мы проверили экспрессию изоформ NOX-1 и NOX-2 и обнаружили, что в устойчивых к действию лекарств клетках HCT-116/R рака толстой кишки наблюдается повышение экспрессии только NOX-2, но не NOX-1, что предполагает изоформно-специфическую функцию фермента NOX. Кроме того, чтобы оценить связь с активацией NOX-2, мы использовали в своей работе специфические ингибиторы для NOX-1 (ML171) и NOX-2 (HDC) и обнаружили, что при обработке клеток DPI и HDC происходит ингибирование активности NOX. Тем не менее ингибирование активности NOX при обработке клеток ML171 было незначительным. В целом эти результаты позволяют предположить, что экспрессия и активация NOX-2 имеет отношение к развитию лекарственной устойчивости клеток HCT-116/R.

5-Фторурацил является широко используемым химиотерапевтическим агентом при лечении колоректального рака [32, 48]. Однако его химиопревентивная активность в клетках рака толстой кишки, устойчивых к действию лекарств, снижена [49]. Наши результаты показали, что при повышенной экспрессии гена *MDR1* клетки HCT-116/R очень устойчивы к воздействию 5-FU. Оказалось, что значение полумаксимальной концентрации 5-FU примерно в 2,9 раза выше в клетках HCT-116/R по сравнению с клетками HCT-116, что может быть результатом повышенной экспрессии P-gp (*MDR-1*). Недавние исследования показали, что опосредованные NOX окислительно-восстановительные изменения ускоряют химиорезистентность [50]. Более того, было показано, что в клетках рака толстой кишки, устойчивых к действию 5-фторурацила, Nrf-2 находится под эпигенетическим контролем [51]. Полученные нами данные согласуются с нашими предыдущими результатами, свидетельствующими о том, что в клетках HCT-116/R происходит активация как NOX, так и Nrf-2. Следовательно, нацеленное воздействие на NOX-2 и Nrf-2 может повысить чувствительность клеток HCT-116/R к воздействию 5-FU. Наши результаты говорят о том, что комбинация 5-FU с DPI (ингибитор ферментов NOX) и HDC (специфичный ингибитор NOX-2) способствует выраженной гибели клеток в результате апоптоза по сравнению с обработкой клеток HCT-116/R только одним 5-FU. Кроме того, комбинированная обработка клеток 5-FU и ML385 (специфичный ингибитор

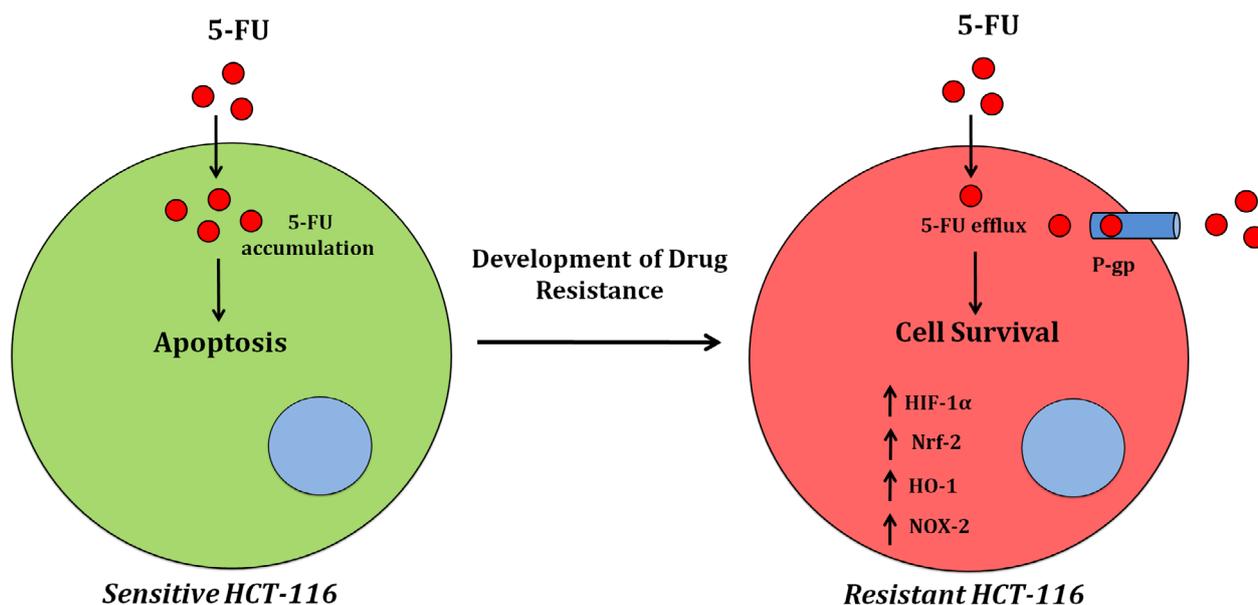


Рис. 8. Схематическое изображение изменений редокс-сигнальных путей при развитии устойчивых к действию 5-фторурацила фенотипов клеток (HCT-116) при раке толстой кишки человека

Nrf-2) приводила к аналогичным результатам. Однако при обработке клеток 5-FU вместе с ML171 (специфичный ингибитор NOX-1) не было обнаружено каких-либо заметных изменений, что указывает на важную роль белков NOX-2 и Nrf-2 в устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что MDR1 играет важную роль в развитии фенотипов лекарственной устойчивости раковых клеток. Мы также обнаружили значительное увеличение активности NOX и повышенную продукцию АФК в клетках HCT-116/R. Интересно, что в клетках HCT-116/R также было обнаружено существенное увеличение экспрессии и активности редокс-белков – NOX-2 и Nrf-2 (рис. 8). Кроме того, повышение экспрессии и активация NOX-2 и Nrf-2 способствовали возникновению устойчивости клеток HCT-116/R к действию 5-фторурацила. Таким образом, гены резистентности к лекарствам способствуют репрограммированию редокс-гомеостаза внутри клеток путем активации NOX-2- и Nrf-2-зависимых сигнальных путей, кото-

рые могут быть в будущем использованы в качестве терапевтических мишеней для понижения устойчивости клеток рака толстой кишки к действию лекарств.

Благодарности. Авторы признательны SERB, Департаменту науки и технологий Нью-Дели Правительства Индии за предоставленный Ч. Патхаку исследовательский грант (EMR/2016/002574). Авторы благодарны ICMR Правительства Индии за предоставленную Ф.У. Вайдия научную стажировку и DST-INSPIRE за предоставленную Б. Н. Вагхела стажировку. Авторы благодарны Индийскому институту передовых исследований и фонду Пури за возможность получения образования в Индии, предоставление инфраструктуры и научно-исследовательского центра.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawla, P., Sunkara, T., and Barsouk, A. (2019) Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors, *Prz. Gastroenterol.*, **14**, 89.
2. Beheshti, M. (2018) Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. Research review, *Int. Pharm. Acta*, **1**, 88-89.
3. Longley, D., and Johnston, P. (2005) Molecular mechanisms of drug resistance, *J. Pathol.*, **205**, 275-292.
4. Tanguturi, P., Kim, K.-S., and Ramakrishna, S. (2020) The role of deubiquitinating enzymes in cancer drug resistance, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **85**, 627-639.

5. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., and Baradaran, B. (2017) The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review, *Adv. Pharm. Bull.*, **7**, 339.
6. Choi, Y. H., and Yu, A. M. (2014) ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development, *Curr. Pharm. Des.*, **20**, 793-807.
7. Locher, K. P., and Borths, E. (2004) ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF, *FEBS Lett.*, **564**, 264-268.
8. Holland, I. B. (2011) ABC transporters, mechanisms and biology: an overview, *Essays Biochem.*, **50**, 1-17.
9. Gottesman, M. M., and Pastan, I. H. (2015) The role of multidrug resistance efflux pumps in cancer: revisiting a JNCI publication exploring expression of the *MDR1* (P-glycoprotein) gene, *J. Natl. Cancer Inst.*, **107**, djv222, doi: 10.1093/jnci/djv222.
10. Gottesman, M. M., Fojo, T., and Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 48-58.
11. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., et al. (2019) ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 6175804, doi: 10.1155/2019/6175804.
12. Maryanovich, M., and Gross, A. (2013) A ROS rheostat for cell fate regulation, *Trends Cell Biol.*, **23**, 129-134.
13. Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.*, **24**, R453-R462.
14. Crane, F., and Low, H. (2008) Reactive oxygen species generation at the plasma membrane for antibody control, *Autoimmun. Rev.*, **7**, 518-522.
15. Krause, K.-H. (2004) Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **57**, S28-S29.
16. Weyemi, U., Redon, C. E., Parekh, P. R., Dupuy, C., and Bonner, W. M. (2013) NADPH oxidases NOXs and DUOXs as putative targets for cancer therapy, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **13**, 502-514.
17. Juhasz, A., Markel, S., Gaur, S., Liu, H., Lu, J., et al. (2017) NADPH oxidase 1 supports proliferation of colon cancer cells by modulating reactive oxygen species-dependent signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **292**, 7866-7887.
18. Banskota, S., Regmi, S. C., and Kim, J.-A. (2015) NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7, *Mol. Cancer*, **14**, 123.
19. Jaramillo, M. C., and Zhang, D. D. (2013) The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer, *Genes Dev.*, **27**, 2179-2191.
20. Kessel, D., Beck, W. T., Kukuruga, D., and Schulz, V. (1991) Characterization of multidrug resistance by fluorescent dyes, *Cancer Res.*, **51**, 4665-4670.
21. Shen, F., Chu, S., Bence, A. K., Bailey, B., Xue, X., et al. (2008) Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **324**, 95-102.
22. Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., et al. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation, *Biochem J.*, **406**, 105-114.
23. Waghela, B. N., Sharma, A., Dhumale, S., Pandey, S. M., and Pathak, C. (2015) Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells, *PLoS One*, **10**, e0117526.
24. Vaidya, F. U., Sharma, R., Shaikh, S., Ray, D., Aswal, V. K., and Pathak, C. (2019) Pluronic micelles encapsulated curcumin manifests apoptotic cell death and inhibits pro-inflammatory cytokines in human breast adenocarcinoma cells, *Cancer Rep.*, **2**, e1133.
25. Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018) Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1727-1745.
26. Furfaro, A., Traverso, N., Domenicotti, C., Piras, S., Moretta, L., et al. (2016) The Nrf2/HO-1 axis in cancer cell growth and chemoresistance, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 1958174, doi: 10.1155/2016/1958174.
27. Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., et al. (2019) Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements, *Biomolecules*, **9**, 735.
28. Wang, X., Son, Y.-O., Chang, Q., Sun, L., Hitron, J. A., et al. (2011) NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium, *Toxicol. Sci.*, **123**, 399-410.
29. Das, D., Preet, R., Mohapatra, P., Satapathy, S. R., Siddharth, S., et al. (2014) 5-Fluorouracil mediated anti-cancer activity in colon cancer cells is through the induction of adenomatous polyposis *Coli*: implication of the long-patch base excision repair pathway, *DNA Rep.*, **24**, 15-25.
30. Grem, J. L. (2000) 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development, *Invest. New Drugs*, **18**, 299-313.
31. Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., and Chen, W.-S. (2008) 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies, *Molecules*, **13**, 1551-1569.
32. Pardini, B., Kumar, R., Naccarati, A., Novotny, J., Prasad, R. B., Forst, A., et al. (2011) 5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **72**, 162.
33. Kovalev, A. A., Tsvetaeva, D. A., and Grudinskaja, T. V. (2013) Role of ABC-cassette transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in the development of primary and acquired multiple drug resistance in patients with early and metastatic breast cancer, *Exp. Oncol.*, **35**, 287-290.
34. Van der Jeught, K., Xu, H.-C., Li, Y.-J., Lu, X.-B., and Ji, G. (2018) Drug resistance and new therapies in colorectal cancer, *World J. Gastroenterol.*, **24**, 3834.
35. Liu, Y., Li, Q., Zhou, L., Xie, N., Nice, E. C., et al. (2016) Cancer drug resistance: redox resetting renders a way, *Oncotarget*, **7**, 42740.
36. Kamata, T. (2009) Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development, *Cancer Sci.*, **100**, 1382-1388.
37. Adachi, Y., Shibai, Y., Mitsushita, J., Shang, W., Hirose, K., and Kamata, T. (2008) Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6, *Oncogene*, **27**, 4921-4932.
38. Martner, A., Aydin, E., and Hellstrand, K. (2019) NOX2 in autoimmunity, tumor growth and metastasis, *J. Pathol.*, **247**, 151-154.
39. Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution, *Genes Cells*, **16**, 123-140.
40. Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., et al. (2008) Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer, *Gastroenterology*, **135**, 1358-1368.e1354.
41. Sekhar, K. R., Crooks, P. A., Sonar, V. N., Friedman, D. B., Chan, J. Y., et al. (2003) NADPH oxidase activity is essential for Keap1/Nrf2-mediated induction of GCLC in response to 2-indol-3-yl-methylenequinclidin-3-ols, *Cancer Res.*, **63**, 5636-5645.

42. Wu, R. F., and Terada, L. S. (2009) Ras and Nox: linked signaling networks? *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1276-1281.
43. Laurent, E., McCoy, J. W. 3rd, Macina, R. A., Liu, W., Cheng, G., et al. (2008) Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras, *Int. J. Cancer*, **123**, 100-107.
44. Tao, S., Wang, S., Moghaddam, S. J., Ooi, A., Chapman, E., et al. (2014) Oncogenic KRAS confers chemoresistance by upregulating NRF2, *Cancer Res.*, **74**, 7430-7441.
45. Kovac, S., Angelova, P. R., Holmström, K. M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2015) Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 794-801.
46. Han, M., Zhang, T., Yang, L., Wang, Z., Ruan, J., and Chang, X. (2016) Association between NADPH oxidase (NOX) and lung cancer: a systematic review and meta-analysis, *J. Thorac. Dis.*, **8**, 1704.
47. Parekh, A., Das, S., Parida, S., Das, C. K., Dutta, D., et al. (2018) Multi-nucleated cells use ROS to induce breast cancer chemo-resistance *in vitro* and *in vivo*, *Oncogene*, **37**, 4546-4561.
48. Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 330-338.
49. He, L., Zhu, H., Zhou, S., Wu, T., Wu, H., et al. (2018) Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 1-12.
50. Kim, E.-K., Jang, M., Song, M.-J., Kim, D., Kim, Y., and Jang, H. H. (2019) Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells, *Antioxidants*, **8**, 471.
51. Kang, K., Piao, M., Kim, K., Kang, H., Chang, W., et al. (2014) Epigenetic modification of Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells: involvement of TET-dependent DNA demethylation, *Cell Death Dis.*, **5**, e1183-e1183.

UPREGULATION OF NOX-2 AND Nrf-2 PROMOTES 5-FLUOROURACIL-RESISTANCE OF HUMAN COLON CARCINOMA (HCT-116) CELLS*

Bh. N. Waghela¹, F. U. Vaidya¹, and Ch. Pathak^{1,2**}

¹ *School of Biological Sciences & Biotechnology, Indian Institute of Advanced Research, Koba Institutional Area, 382426 Gandhinagar, India; E-mail: cmpathak@iiar.res.in*

² *Amity Institute of Biotechnology, Amity University, 122413 Gurgaon, India*

Altered expression of cellular redox genes and proteins contributes to invasion, metastasis, and drug resistance in cancer. NADPH oxidase (NOX) isoforms are the pro-oxidant enzymes that generate ROS as a primary product. Dysregulation of NOX activity and expression alters ROS generation, which either directly or indirectly modulates cell death and survival signaling during the progression of cancer. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) is an inducible transcription factor, which transcribes an array of antioxidant genes and protects cancer cells from the oxidative stress. Both NOXs and Nrf-2 participate in the regulation of cellular redox homeostasis; but their dysregulation promotes oxidative stress, which contributes to the progression of different types of cancer. Indeed, the role of NOX isoforms and Nrf-2 in developing the drug resistance in cancer is largely unknown. In the present study, we have explored the association of NOX isoforms and Nrf-2 signaling with the *MDR1* gene expression in colon carcinoma cells (HCT-116/R). The *MDR1* gene was overexpressed to develop resistant HCT-116/R cells and the NOX activation and ROS generation were monitored. We also assessed the role of NOX isoforms and Nrf-2 in the 5-fluorouracil (5-FU) mediated apoptotic cell death of HCT-116/R cells. The HCT-116/R cells demonstrated higher expression of HIF-1 α , Nrf-2, and HO-1 and were highly resistant to 5-FU; they also displayed upregulated expression and activity of NOX-2, as well as elevated ROS levels. Interestingly, the treatment with HDC, a specific NOX-2 inhibitor, reduced the ROS levels in HCT-116/R cells. The treatment with HDC and ML-385 (specific inhibitor of Nrf-2) augmented the 5-FU-mediated apoptotic cell death of HCT-116/R cells, which suggests that NOX-2 and Nrf-2 are involved in the development of the chemoresistant phenotype of these cells. Taken together, NOX-2 and Nrf-2 are associated with developing drug resistance of colorectal cancer cells and might be potential targets to overcome drug resistance during cancer therapy.

Keywords: 5-fluorouracil, drug resistance, HO-1, MDR1, NOX-2, Nrf-2, ROS

РОЛЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНЕЙ, СВЯЗАННЫХ С АНОМАЛЬНЫМ НАКОПЛЕНИЕМ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ

Обзор

© 2021 Н.С. Ильинский^{1*}, С.В. Нестеров^{1,2}, Е.И. Шестопёрова¹,
А.В. Фонин^{1,3}, В.Н. Уверский^{1,4}, В.И. Горделий^{1,5,6}

¹ Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний,
Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный,
Московская обл., Россия; электронная почта: ilinsky_nick@mail.ru

² Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404 Москва, Россия

³ Институт цитологии Российской академии наук, 194064 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Отдел молекулярной медицины, Медицинский колледж им. Морсани,
Университет Южной Флориды, 33612 Тампа, США

⁵ Юлихский исследовательский центр, 52428 Юлих, Германия

⁶ Институт структурной биологии, 38000 Гренобль, Франция

Поступила в редакцию 08.08.2020

После доработки 21.08.2020

Принята к публикации 24.08.2020

Старение является системной первопричиной возрастных заболеваний, в частности протеинопатий. Действительно, большинство болезней, связанных с неправильным сворачиванием белка, являются спорадическими, а вероятность их возникновения растёт по мере старения организма. В данном обзоре рассмотрен процесс образования агрегатов белков и их патогенность, устройство клеточной системы поддержания протеостаза. Показано, как токсичность агрегатов нарушает важные клеточные процессы и приводит к протеинопатиям. Проанализировано, как проявления старения (дисфункция митохондрий, дисбаланс сигнальной системы, изменения генома и эпигенома) делают возможным патогенез протеинопатий – усиливают агрегацию напрямую и через дискоординацию стресс-ответов. Проведённый анализ позволяет наметить перспективы поиска воздействий для лечения протеинопатий и достижения здорового долголетия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеостаз, агрегация белков, протеинопатия, старение, дисфункция митохондрий, мутации, эпигенетические изменения.

DOI: 10.31857/S0320972521030040

ВВЕДЕНИЕ: СТАРЕНИЕ СПОСОБСТВУЕТ НАРУШЕНИЮ ПРОТЕОСТАЗА

Старение является процессом постепенного нарушения гомеостаза, то есть функциональ-

ности клетки, различных систем и организма в целом. Одна из основных концепций старения утверждает, что данный процесс является запланированным и, возможно, базируется на программе развития организма [1]. Предполагается,

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; м- и тРНК – матричная и транспортная РНК; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Akt – серин/треониновая протеинкиназа В; АМПК – протеинкиназа, активируемая аденозинмонофосфатом; АТФ – аденозинтрифосфат; *APOE* – ген, кодирующий белок аполипопротеин Е; APP – белок-предшественник амилоида; Аβ – бета-амилоид; ЕТС – электрон-транспортная цепь; FOXO – фактор транскрипции семейства «forkhead box» класса О; FUS – белок, ассоциированный с саркомой; Grp78 – белок, регулируемый глюкозой, 78; hNRNPA1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А1; HSF1 – транскрипционный фактор теплового шока; HSP – белок теплового шока, шаперон; IR/IGFR – рецепторы инсулина и инсулиноподобных факторов роста; IIS – инсулиновый и инсулиноподобный сигнальный каскад; mTOR – серин/треониновая протеинкиназа, мишень рапамицина млекопитающих; mtTERT – теломераза, локализованная в митохондриях; NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; NBR1 – белок, кодируемый геном, соседствующим с *BRCA1*; NMDA – N-метил-D-аспартат; NRF2 – ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором; Pin1 – пептидил-пролил-*цис/транс*-изомераза 1; SIRT1 – сиртуин 1; SQSTM1/p62 – секвестосома-1, убиквитин-связывающий белок p62; SOD1 – супероксиддисмутаза 1; TDP-43 – ДНК-связывающий белок TAR; TFEB – транскрипционный фактор EB; TIA-1 – T-клеточный внутренний антиген 1; TRiC/CCT – TCP-1 кольцевой белковый комплекс (шаперонин, содержащий TCP-1); ULK1 – серин/треониновая протеинкиназа; UPR – стресс-ответ на несвёрнутые белки; UPS – убиквитин-протеасомная система.

* Адресат для корреспонденции.

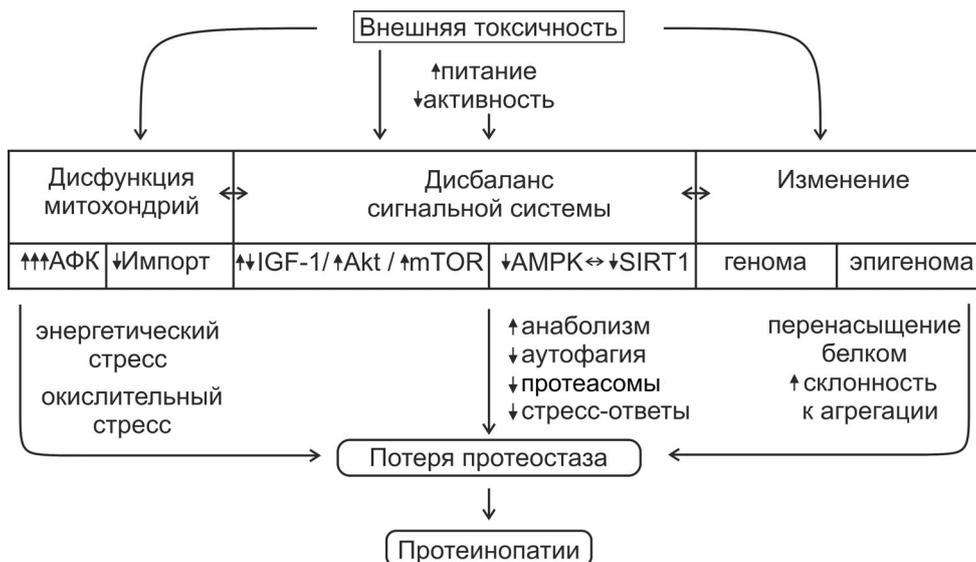


Рис. 1. Влияние дисфункции митохондрий, дисбаланса сигнальной системы, изменений генома и эпигенома на потерю протеостаза проявляется в усугублении действия стрессов (энергетического, окислительного, подавление стресс-ответов), увеличении склонности белков к агрегации (мутантные формы и перенасыщение белком), нарушении системы поддержания протеостаза (например, аутофагии)

что накопление с возрастом повреждений клетки, вызванных внешними, внутренними стрессами и ослаблением защитных механизмов, вместе с заложенной программой старения приводит к одряхлению индивида.

Протеостаз — гомеостаз белков, результат работы систем синтеза и контроля качества белков. Протеостаз заключается в наличии функциональных белков в клетке и вне её в нужных концентрациях, в нужное время и на правильный срок. Потеря протеостаза состоит в нарушении сворачивания белка и ослаблении системы контроля качества белков, что ведёт к накоплению токсичных белковых агрегатов и развитию протеинопатий. Под «агрегацией» в данной работе подразумевается неспецифичная и патогенная агрегация белков, которая приводит к потере функциональности (в отличие от естественной олиго- или полимеризации, формирующей функциональные белковые комплексы).

Клеточное старение характеризуется потерей протеостаза, дисфункцией митохондрий, изменением генома и эпигенома, нарушением работы сигнальной (управляющей) системы [2]. Эти повреждения усиливают друг друга, нарушая целостность гомеостаза клетки. Накопление большого количества повреждённых клеток приводит к возрастным заболеваниям, в том числе к протеинопатиям. О вкладе старения в патогенез болезней, связанных с аномальным накоплением белковых агрегатов, свидетельствует их преимущественно приобретённый,

спорадический характер и увеличение частоты возникновения с возрастом [3].

В настоящей работе представлены данные о том, как поддерживается протеостаз — основы сворачивания и агрегации белка, защитные механизмы против накопления агрегатов, возникновение протеинопатий как результат неэффективности системы поддержания протеостаза и нескомпенсированной токсичности агрегатов.

Наконец, проанализирована роль проявлений старения в нарушении протеостаза и развитии протеинопатий (рис. 1). Показано, что старение усугубляет действие стрессов и подавляет защитные механизмы, что напрямую и через ослабление системы поддержания протеостаза приводит к увеличению склонности белков к агрегации, способствует патогенезу протеинопатий. Изложены возможные вмешательства для лечения заболеваний, вызванных белковой агрегацией, в том числе как основа рассматривается профилактика старения.

ПРОЦЕСС АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

В этом разделе рассмотрены основы фолдинга и агрегации белка, а также причины токсичности агрегатов.

Основы фолдинга, естественная агрегация. В геноме закодирована конечная пространственная структура белка (кроме внутренне неупорядоченных белков, см. ниже) и путь его достижения (фолдинг) [4]. Сворачивание многих белков

может быть осуществлено только с участием шаперонов [5]. Однако даже в физиологических условиях возможны сбои в сворачивании белков, что, в свою очередь, может привести к их агрегации [6]. Агрегация может возникнуть по ряду причин.

Во-первых, высокая концентрация макромолекул в клетке (макромолекулярный краудинг) может привести к взаимодействию между сворачивающейся аминокислотной цепью и другими молекулами, а также возникновению ненативных контактов участков полипептидной цепи [7].

Во-вторых, агрегация возникает из-за большого количества неспецифических взаимодействий подвижных участков полипептидной цепи, как правило, не входящих в упорядоченную вторичную структуру белка [8, 9].

В-третьих, склонность к агрегации проявляют «сложные» белки: многодоменные [9], мембранные [10], нуждающиеся в посттрансляционных модификациях для созревания [11].

В-четвёртых, к агрегации могут приводить невысокие энергетические барьеры между различными конформационными состояниями полипептидной цепи, присущие, в частности, внутренне неупорядоченным белкам (англ. абб. IDPs от *intrinsically disordered proteins*) [12].

Внутренне неупорядоченные белки являются особыми с точки зрения фолдинга. Само название подчёркивает, что неупорядоченность их структуры является неотъемлемым свойством этих белков. Фактически структура внутренне неупорядоченного белка находится в динамическом равновесии между различными конформерами, разделёнными незначительными энергетическими барьерами. Вследствие этого любое незначительное изменение внешних условий может приводить к существенному изменению энергетической поверхности белка. Это обеспечивает полифункциональность внутренне неупорядоченных белков. В эукариотическом протеоме более половины белков являются в той или иной степени неупорядоченными [13]. Мозаичная гетерогенная пространственно-временная организация IDPs способствует склонности этих белков к агрегации при изменении внешних условий. К внутренне неупорядоченным относится ряд белков, агрегация которых наблюдается при нейродегенеративных заболеваниях (β -амилоид, тау-белок, островковый амилоидный полипептид, α -синуклеин и др.) [14].

Склонность к образованию амилоидных фибрилл зависит от первичной структуры белка, однако при определённых условиях практически все белки могут переходить в форму амилоидных фибрилл [15, 16].

Внешние и внутренние стрессы, приводящие к агрегации. Генотоксический и протеотоксический стрессы нарушают процессы транскрипции и трансляции, а также сворачивания белка; они могут присутствовать в острой и хронической формах. Стабильность (растворимость) белка зависит от кислотности, ионного баланса, окислительно-восстановительного потенциала среды, температуры, давления, наличия соразвителей [6], присутствия химических токсинов, таких как тяжёлые металлы, пестициды [17], а также токсичных метаболитов, побочных продуктов обмена веществ [18]. Кроме того, сами агрегаты стимулируют вторичную и последующую агрегации, что обусловлено выгодностью взаимодействия между экспонированными гидрофобными участками неправильно свёрнутых белков и высокой конформационной стабильностью белковых агрегатов.

Молекулярные механизмы токсичности белковых агрегатов. Существуют две основные стабильные формы белковых агрегатов: аморфные агрегаты и амилоидные фибриллы. Несмотря на то, что аморфные агрегаты зачастую богаты β -листами, они не имеют высокой упорядоченности и реже ассоциированы с заболеваниями. Примером такой болезни может являться катаракта, при которой образуются аморфные агрегаты α -кристаллина (принадлежит к семейству малых шаперонов [19]). Как правило, формирование аморфных агрегатов является очень быстрым процессом.

Амилоидные фибриллы имеют упорядоченную β -структуру, в которой параллельные или антипараллельные β -нити сориентированы перпендикулярно оси агрегата. Кинетика спонтанного процесса фибриллообразования, как правило, описывается сигмоидальной кривой, где начальный период соответствует медленному процессу нуклеации, затем следует фаза экспоненциального роста фибрилл (элонгации), завершающаяся фазой равновесия. Некоторые амилоидные фибриллы обладают функцией в клетке, например, премеланосомный белок PMEL17 работает как шаблон для полимеризации меланина. Однако в большинстве случаев амилоиды токсичны для клетки. При этом совокупность данных свидетельствует о том, что растворимые протофибриллярные промежуточные агрегаты существенно более токсичны по сравнению со зрелыми фибриллами [3].

Можно выделить следующие основные причины токсичности агрегатов:

1. Ингибирование функциональности белка при агрегации через уменьшение числа его активных единиц в клетке.

2. Ингибирование активности белков при их включении в состав агрегатов (факторы транскрипции [20], шапероны [5], элементы протеасом [21], факторы ядерно-цитоплазматического транспорта [20]). Белки, склонные к связыванию с агрегатами, как правило, метастабильны, содержат внутренне неупорядоченные области (домены с низкой сложностью аминокислотной последовательности) [22]. Также коагрегации способствует подобие первичных структур участвующих в ней белков. При этом опасность представляют не только «аморфные» агрегированные тела, но и структурированные фибриллы [10].

3. Нарушение целостности мембран (порообразование растворимыми олигомерами [23], деформация или пронизывание фибриллами [24]), особенно критичное для митохондрий (приводящее к нарушению их функций при взаимодействии с мутантными белками гентингином, SOD1, β -амилоидом, α -синуклеином, паркином, DJ-1, PINK1 [25]) и плазматической мембраны нейронов.

Ослабление системы поддержания протеостаза способствует дальнейшему усилению агрегации (автокатализ), которое может привести к одновременному появлению двух разных протеинопатий, таких как болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофической склероз или болезнь Паркинсона [26]. Наиболее выраженная роль белковой агрегации в старении проявляется в её ассоциации с клеточной дегенерацией, приводящей к возрастным заболеваниям [3]. Ключевые примеры таких болезней, поражающих центральную нервную систему, кратко описаны в справке «Протеинопатии».

СИСТЕМА ПОДДЕРЖАНИЯ ПРОТЕОСТАЗА И ЕЁ ОСЛАБЛЕНИЕ ПРИ СТАРЕНИИ

Стрессы и природная предрасположенность белков к агрегации приводят к неправильному фолдингу или их (частичному) разворачиванию и образованию токсичных агрегатов. В данном разделе рассмотрены защитные механизмы, препятствующие появлению и накоплению агрегатов.

Система поддержания протеостаза в клетке человека включает в себя около 2 000 белков [27]. Шапероны участвуют в сворачивании вновь синтезируемых белков и в поддержании их нативных конформаций, в предотвращении неправильного сворачивания (в том числе при транспортировке) и агрегации, осуществлении дезагрегации (разборки), контролируемого разворачивания неправильно свёрнутых молекул

белка и их последующего исправления (рефолдинга), а также способствуют распознаванию протеолитическими системами неправильно свёрнутых белков, помогают поддерживать белки в пригодном к деградации состоянии [5].

Протеазы, убиквитин-протеасомная система и аутофагия осуществляют регулируемую деградацию неверно свёрнутых белков и агрегатов. Протеолитическая система также контролирует время функционирования белка, абсолютную и относительную концентрации белков-компонентов комплексов, обеспечивая осуществление всех основных клеточных функций [28].

Только согласованное функционирование всех систем протеостаза эффективно предотвращает накопление неправильно свёрнутых белков и токсичных агрегатов. Например, несмотря на наличие системы шаперонов, от 5 до 30% всех вновь синтезированных белков не сворачиваются должным образом, имеют склонность к агрегации и должны быть направлены на немедленную деградацию [27].

Увеличение, даже незначительное, по сравнению с физиологической нормой агрегационной способности белка и/или его внутриклеточной концентрации ведёт к агрегации [29]. Система контроля качества протеостаза, настроенная на норму для каждого белка, способна сдерживать снижение растворимости лишь до определенного предела. Было обнаружено, что белки с высоким уровнем экспрессии вносят основной вклад в общую агрегацию белков при достижении ими критической концентрации. Этот эффект называется перенасыщением белком (supersaturation) [30]. Подавление производства патологического, склонного к агрегации белка, приводит к разрушению накопившихся агрегатов и снимает симптомы заболевания [31].

Система шаперонов как основа системы поддержания протеостаза. Протеотоксические стрессы приводят к появлению ненативных конформаций белков. При недостаточности системы поддержания протеостаза HSF1 (транскрипционный фактор белков теплового шока) освобождается от ингибирующей связи с шаперонами [32] и запускает синтез новых шаперонов, обеспечивая стресс-ответ.

Цитозольный ответ на протеотоксический стресс выполняют АТФ-зависимые шапероны HSP70 (с кошаперонами HSP40, HSP110), HSP90, шаперонин TRiC/CCT (ассистирует сворачиванию 10% протеома). Подавление агрегации происходит через связывание шаперонов со склонными к агрегации конформациями, дезагрегацию, рефолдинг или деградацию. Уже сформировавшиеся агрегаты могут быть экра-

нированы шаперонами, что блокирует вредные взаимодействия, позволяет удалить такие агрегаты через разборку или аутофагию [33].

При старении в клетке происходит изменение профиля экспрессии шаперонов. Подавляется экспрессия АТР-зависимых шаперонов, повышается экспрессия АТР-независимых малых шаперонов sHSP, что позволяет поддерживать протеостаз при недостатке энергии [34]. В результате токсичные растворимые олигомеры не идут на разборку или рефолдинг, вместо этого запускается контролируемая агрегация. Малые шапероны объединяют агрегаты в тельца включения (содержат аморфные или амилоидные агрегаты), уменьшая реакционную поверхность агрегатов, сокращая таким образом требуемое число связанных шаперонов [35]. Соответственно, гиперэкспрессия малого шаперона HSP-16 может приводить к увеличению продолжительности жизни (у нематод [36]).

При транспортировке белка в определенный субклеточный компартмент цитозольные шапероны предотвращают преждевременное сворачивание белка. Шапероны защищают трансмембранные гидрофобные области мембранных белков от водной среды и обеспечивают прохождение через мембраны органелл. Шапероны присутствуют в эндоплазматическом ретикулу (ЭПР) (например, шаперон GRP78 [37]), в митохондриях (например, HSP60 [38]), где способствуют функциональному рефолдингу в месте назначения. Органельные шапероны также участвуют в нейтрализации цитозольных агрегатов. При тепловом стрессе определённые неправильно свёрнутые белки, не имеющие митохондриальной сигнальной последовательности, с помощью HSP104 направляются в митохондрии [39]. Более того, шапероны органелл играют критическую роль в обеспечении асимметричности деления в дрожжах [40] и стволовых клетках [41], способствующей уменьшению количества агрегатов в дочерней или стволовой клетке соответственно.

Отдельный набор шаперонов действует для поддержания функциональных конформаций секретрируемого протеома во внеклеточном пространстве (внеклеточная система контроля качества). Наличие такого стресс-ответа особенно важно при прионном течении болезни (см. справку «Протеинопатии»), поскольку он способствует поглощению клеткой неверно свёрнутых или агрегированных белков (в том числе прионных) для дальнейшей деградации [42].

Необходимо также упомянуть о существовании шаперонов-изомераз, обеспечивающих правильное сворачивание и стабильность белков че-

рез изомеризацию пролиновых остатков и образование дисульфидных связей [43]. Поскольку активность серин/треонин-специфических протеинкиназ сильно зависит от изомера пролина, пептидил-пролил-*цис/транс*-изомеразы Pin1 играют важную роль в контроле многих процессов, включая стресс- и иммунный ответ, клеточное развитие и рост, реакцию, дифференцировку и выживание нейронов [44].

Система шаперонов способна ингибировать агрегацию белков, определяющих патологию нейродегенеративных заболеваний [3]. У мутантных мышей с пониженным уровнем белков теплового шока наблюдается ускоренное старение, а в долгоживущих линиях наблюдается высокая активность шаперонов [45]. Активация транскрипционного фактора теплового шока HSF1, сверхэкспрессия шаперонов или применение фармакологических шаперонов способствуют увеличению продолжительности жизни [46].

Эндоплазматический стресс и ответ на несвёрнутые белки: ингибирование трансляции. Эндоплазматический ретикулум обеспечивает синтез, сворачивание и процессирование около трети от общего числа белков. В случае длительного и неисправляемого аномального фолдинга белков возникает ЭПР-стресс, на который активируется ответ на несвёрнутые белки (англ. абб. UPR от unfolded protein response). UPR реализуется в трех направлениях. Во-первых, временно останавливается трансляция белков, характерных для бесстрессового режима, что уменьшает производство дефектных белков, снижает нагрузку на шапероны и системы деградации. Во-вторых, увеличивается производство шаперонов, запускается протеасомная деградация. В-третьих, при отсутствии снижения количества агрегатов в течение определённого времени UPR может вызвать апоптоз, потерю дифференцировки (дедифференцировку; показано для секретрирующих клеток), пироптоз, некроптоз [37].

Нужно отметить, что временное снижение уровня трансляции является ключевым способом поддержания протеостаза и противодействия старению в целом [2]. Например, для уменьшения количества агрегатов с возрастом происходит адаптационное ингибирование трансляции (у нематод [47]). Изменение окислительно-восстановительного потенциала, дисфункция шаперонов-изомераз в ЭПР нарушают образование дисульфидных связей, подавляют UPR, приводят к накоплению неправильно свёрнутых белков и агрегации [37]. Устойчивая сверхактивация UPR (наблюдается при старении, избыточности питания и малой активности

организма) играет роль в развитии заболеваний. При хроническом подавлении трансляции происходит гибель нейронов из-за потери критических белков и активации апоптоза. Ингибирование UPR может стать средством лечения болезнью Крейтцфельдта–Якоба, Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона [48].

Стресс-гранулы. Защита от протеотоксичности через подавление трансляции может осуществляться независимо от шаперонов при образовании стресс-гранул. Стресс-гранулы представляют собой цитоплазматические немембранные компартменты, появляющиеся в клетке в ответ на стресс и распадающиеся после перехода клетки в нормальное состояние. Основная функция этих RNP (RNA/protein) структур состоит в регулировании стресс-ответа клетки и предотвращении повреждения генетического материала в неблагоприятных условиях. Регуляция состава и свойств стресс-гранул обеспечивается посттрансляционными модификациями каркасных белков этих образований, изменением pH, концентрации солей, температуры окружающей среды и другими факторами. Стрессовое воздействие на клетку вызывает арест трансляции и диссоциацию полирибосомального комплекса. Согласно современным представлениям, диссоциация полирибосомы и не успевшей подвергнуться трансляции мРНК параллельно сопровождается переходом каркасных внутренне неупорядоченных белков стресс-гранул в жидкокапельную фазу с последующим привлечением свободной мРНК и других компонентов этих немембранных органелл.

Ряд нейродегенеративных заболеваний, в том числе боковой амиотрофической склероз, сопровождается деградацией стресс-гранул вследствие включения в их состав мутантных форм белков FUS, TDP-43, hNRNPA1 с последующим образованием этими белками амилоидоподобных фибрилл. Образующие мутантными белками стресс-гранул амилоидоподобные фибриллы токсичны для клеток, однако конкретный механизм их действия неизвестен. Трансформация стресс-гранул в амилоидные фибриллы при нейродегенеративных заболеваниях может быть обусловлена включением в состав стресс-гранул мутантных белков FUS, TDP-43, hNRNPA1 и TIA-1. Нарушение деградации стресс-гранул также может привести к формированию в клетке упорядоченных амилоидных фибрилл [49].

Протеолитические системы как последняя стадия UPR. Несмотря на согласованную работу шаперонов и других защитных механизмов, из-за естественных причин и наличия протео-

токсических стрессов появляются неверно свернутые белки и агрегаты, которые должны быть подвержены избирательной деградации. Рассмотрим роль убиквитин-протеасомной и аутофаго-лизосомальной систем в патогенезе протеинопатий.

Убиквитин-протеасомная система (англ. абб. UPS от ubiquitin-proteasome system) состоит из системы маркировки подлежащих деградации белков убиквитином и протеасом, больших белковых комплексов, содержащих разрезающие субстрат протеазы [28]. Синхронизированная сборка протеасом является шаперон-зависимой. Протеасомы деградируют белки, экспортируемые из ЭПР, и цитозольные белки [37]. При этом деградация возможна только для растворимой формы белков, для чего требуются шапероны. С другой стороны, компоненты убиквитиновой системы имеют шаперонные функции [50]. Таким образом, шаперонная система и UPS взаимозависимы.

Количество протеасомных субъединиц увеличивается с возрастом, что, по-видимому, отражает попытку организма удалить aberrантные белки и компенсировать сниженную при старении активность протеасом [51]. Решающая роль UPS в протеинопатиях подтверждается повышением токсичности агрегатов белков при ингибировании протеасом [52]. Усиление экспрессии компонентов убиквитин-протеасомной системы и ингибирование деубиквитиназы повышает устойчивость к протеотоксическому стрессу, продлевает срок жизни дрожжей, нематод и клеток человека [51].

Нерастворимые агрегаты могут быть подвергнуты деградации с помощью аутофаго-лизосомальной системы. Аутофагия заключается в деградации субстрата, попадающего в лизосому напрямую (микроаутофагия), с помощью шаперонов (шаперон-опосредованная и шаперон-управляемая аутофагия) или при слиянии аутофагосомы и лизосомы (макроаутофагия). Также существует эндосомная микроаутофагия, которая осуществляется в поздних эндосомах [3].

Процесс макроаутофагии, позволяющий деградировать большие агрегаты и целые органеллы (митохондрии, пероксисомы), происходит в несколько этапов. Белки, кодируемые генами, связанными с аутофагией (англ. абб. ATG от autophagy-related genes), в частности беклин-1, координируют образование и функционирование фагофора – места сбора субстратов для деградации. Белки SQSTM1/p62, NBR1 захватывают и заносят в фагофор убиквитинированный субстрат, фагофор закрывается, образуя аутофагосому. Далее она сливается с плазматической мембраной (для выброса содержимого во

внеклеточную среду, нетрадиционный путь секреции белков) или с лизосомой (для деградации субстратов). Эффективность расщепления зависит от количества и функциональности лизосом. Синтез лизирующих ферментов и мембранных белков лизосомы контролируется транскрипционным фактором TFEB, для эффективной работы ферментов внутри лизосомы поддерживается рН 4,5–5,0 (АТР-зависимый механизм) [53]. Кроме описанной селективной макроаутофагии существует неизбирательный захват части цитоплазмы с последующим расщеплением [54], как происходит, например, при клеточной смерти через аутофагию.

В целом, лизосомы поддерживают правильное функционирование многих клеточных процессов через перераспределение внутренних резервов аминокислот, ионов, вносят критический вклад в старение [54]. Возрастное снижение эффективности аутофагии (подавление экспрессии генов, связанных с аутофагией, неэффективная митофагия при мутантном белке паркине, защелачивание лизосом и их загрузка липофусцином) определяет развитие протеинопатий [51]. Активация аутофагии (гиперэкспрессия транскрипционного фактора TFEB [55], усиление шаперон-опосредованной аутофагии [56], применение рапамицина, ограничение калорий [57]) является одним из способов борьбы с протеинопатиями.

Таким образом, шаперонная, убиквитин-протеасомная и аутофаго-лизосомальная системы взаимосвязаны и образуют целостную систему поддержания протеостаза.

Деление клеток как механизм уменьшения концентрации агрегатов. Долгоживущие клетки, такие как нейроны, наиболее уязвимы к протеинопатиям [3]. Нарушение описанных выше механизмов защиты протеостаза в этих клетках не компенсируется уменьшением концентрации агрегатов (или склонных к агрегации белков) при делении, как это происходит в митотических клетках. Восстанавливать функции клеток головного мозга помогают стволовые клетки, известные особой устойчивостью протеостаза. Например, в стволовых клетках пациентов с атаксией третьего типа не обнаружены полиглутаминовые (polyQ) агрегаты, в отличие от других клеток [16]. Это происходит благодаря высокой эффективности системы поддержания протеостаза (например, протеасомная активность [58], эффективная сборка комплекса шаперонина TRiC/CCT [59]). Уникальными защитными механизмами стволовых клеток являются возможность существования в неактивном (quiescent) состоянии с низким уровнем метаболизма, асимметричное разделение агрегатов белков

между стволовой и дочерней клеткой, предназначенной для дифференцировки [41].

Асимметричность деления достигается при согласованном действии цитоскелета (центросомы, актиновых, промежуточных, септиновых филаментов), мембраны клетки и органелл (ядра, лизосомы, ЭПР, митохондрий), создающих диффузионные барьеры, локальные каркасы для закоривания шаперонами агрегатов и телец включения, их направленного транспорта в одну из клеток [40].

Деление клеток и асимметричность деления стволовых клеток, прогениторных клеток при образовании долгоживущих, постмитотических клеток являются важными механизмами защиты от накопления агрегатов белков и поддержания гомеостаза в целом.

СПРАВКА. ПРОТЕИНОПАТИИ: ТОКСИЧНОСТЬ АГРЕГАТОВ И НЕДОСТАТОЧНОСТЬ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ПРОТЕОСТАЗА

В данном разделе рассмотрены распространённые нейродегенеративные заболевания, возникающие из-за токсичности агрегатов определённых белков (см. подробный обзор [60]).

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространённым хроническим нейродегенеративным заболеванием, симптомы которого включают потерю памяти и деменцию. Наследуемые формы заболевания (которые составляют ~5% случаев) вызываются мутациями в белке-предшественнике амилоида (APP), пресенилинах 1 и 2. Полиморфизм генов, таких как варианты $\epsilon 4$ и $\epsilon 2$ гена *APOE*, могут влиять на предрасположенность к спорадической болезни Альцгеймера (обнаружены в ~50% случаев). Эти четыре гена ответственны за 30–50% наследственных случаев болезни. Аутосомно-доминантная форма болезни Альцгеймера очень редка (<1%). Физиологически заболевание характеризуется амилоидными отложениями в виде сенильных бляшек бета-амилоида (пептидов A β 40 и A β 42, дефектных продуктов разрезания APP) в нейритах и сосудах головного мозга. Другим маркёром болезни Альцгеймера является наличие нейрофибриллярных клубков из гиперфосфорилированных тау-белков в нейронных и глиальных клетках. Бета-амилоид подавляет мембранные функции (активность глутаматного NMDA-рецептора, функционирование митохондрий, гомеостаз кальция), активирование NADPH-оксидазы. Ингибирование NADPH-оксидазы защищает астроциты и нейроны [61].

Болезнь Паркинсона является вторым наиболее распространённым нейродегенеративным заболеванием, характеризуется двигательной дисфункцией и, во многих случаях, деменцией и депрессией. Основным белком, формирующим характерные для этой болезни аномальные амилоидные фибриллы (тельца Леви), является α -синуклеин. Для наследственных форм этой болезни характерны мутации белков паркин, LRRK2, PINK1, DJ-1 и ATRP13A2. Олигомерный α -синуклеин действует через повреждение мембранных функций (стабильное увеличение проницаемости, приводящее к выбросу ионов кальция) [62], изоляцию агрегатами важных белков (например, компонентов протеасомы [63]).

Болезнь Гентингтона – это наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся деменцией, двигательными и психическими расстройствами. Вызывается увеличенным числом повторов CAG в ДНК, приводящих к образованию удлинённого полиглутаминового домена на N-конце белка гентингина, что определяет образование стабильных амилоидных агрегатов. Фрагменты гентингина нарушают митохондриальный транспорт, усиливают окислительный и энергетический стрессы [64], нарушают функции ключевых элементов внутриклеточной сигнализации и системы поддержания протеостаза [20].

Боковой амиотрофический склероз характеризуется двигательными нарушениями. Возникает при мутациях в *SOD1*, гене каркасных белков стресс-гранул TDP-43 (*TARDBP*), *FUS*, амплификации гексануклеотидного повтора в последовательности гена *C9orf72* [60]. В результате накапливаются агрегаты из *SOD1*, затвердевших стресс-гранул, нарушающих функциональность ядерной, митохондриальной мембран [25], подавляющих протеасомную активность [21].

Прионные болезни вызываются накоплением и амилоидной агрегацией аномальных изоформ прионного белка (PrP), возникающих внутри клетки либо попадающих извне (2% инфекционных случаев для трансмиссивных губчатых энцефалопатий) [60]. Прионоподобное распространение агрегатов в мозге вносит вклад в патогенез болезней Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона [65].

ВОЗРАСТНЫЕ КЛЕТочНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАК ПРИЧИНА УСИЛЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ПРОТЕОСТАЗА

В данном разделе рассмотрена роль процессов естественного старения в повреждении бел-

ков и нарушении системы поддержания протеостаза.

Нефункциональные митохондрии: гормезис, окислительный и энергетический стрессы, митохондриально-лизосомальная ось. Митохондрии являются ключевыми регуляторами выживания, старения и смерти клеток [25]. При старении у пациентов с болезнями Альцгеймера и Паркинсона наблюдается накопление делеций и точечных мутаций в митохондриальной ДНК (из-за ошибок репликации и окислительного повреждения), изменение морфологии митохондрий, дисбаланс в работе электрон-транспортной цепи (англ. абб. ETC от electron transport chain), АТР-синтазы, разобщающих и антиоксидантных белков. В результате снижается митохондриальный потенциал, производство АТР, генерируются активные формы кислорода (АФК), в том числе и в ответ на окислительный стресс [2]. Болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, боковой амиотрофический склероз характеризуются снижением активности комплексов ETC. Дисфункция митохондрий усиливается из-за возрастного нарушения циклов слияния и деления митохондрий [66], что приводит к увеличению их массы и размера [67], блокирует отщепление повреждённых частей митохондрий, нарушая процесс митофагии [68]. Механизмы, по которым дисфункция митохондрий приводит к нарушению протеостаза, показаны на рис. 2.

Мягкий окислительный стресс: гормезис, активация HSF1. Митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода, которые в низких концентрациях выполняют сигнальную функцию, направленную в первую очередь на восстановление энергетики клетки и активацию стрессовых защитных ответов (эффект гормезиса). Такой мягкий окислительный стресс в том числе вызывает ремоделирование хроматина, активацию HSF1 и митохондриального ответа на неправильно свёрнутые белки, восстанавливает протеостаз и повышает продолжительность жизни (показано на нематодах [69]).

Нефункциональные митохондрии подавляют аутофагию, подчёркивая тем самым наличие митохондриально-лизосомальной оси. Нарушение работы комплекса I ETC ослабляет эффективность макроаутофагии из-за энергетического стресса [70]. Нefункциональные митохондрии могут блокировать работу лизосом, заполняя их липофусцином, который образуется в результате реакции железа Fe(II) и перекиси водорода. Возникающие при этом АФК способствуют появлению сшивков в белках (особенно гликопротеинах, конечных продуктах гликирования),

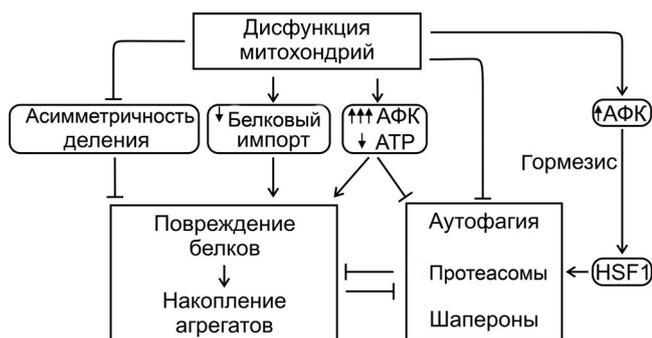


Рис. 2. Дисфункция митохондрий нарушает протеостаз. Умеренный синтез АФК митохондриями приводит к адаптивному стресс-ответу (эффект гормезиса). Избыточный синтез АФК (окислительный стресс) способствует повреждению белков, в том числе защитной системы. Снижение синтеза АТР (энергетический стресс) нарушает работу энергезависимой системы поддержания протеостаза. Нарушения импорта приводят к агрегации митохондриальных белков в цитозоле, недоступности митохондрии как вспомогательного места деградации цитозольных агрегатов. Снижение токсичности агрегатов путём разбавления и асимметричного распределения при делении клетки также ослабляется дисфункцией митохондрий

жирных кислот мембран митохондрии и лизосомы [71]. Нарушение лизосомальной активности препятствует дальнейшей митофагии и обновлению митохондрий. Восстановление работы лизосом может способствовать нормализации функционирования митохондрий (через эффективную митофагию), восстановлению протеостаза и обращению процесса старения отдельной клетки. Так проявляется необходимость согласованной работы митохондрий и лизосом [72].

Энергетический и острый окислительный стресс: повреждение ДНК и вредные посттрансляционные модификации белков. Митохондриальная дисфункция усугубляет окислительный стресс, вызывающий повреждения ДНК и белков. Одновременный дефицит АТР приводит к недостаточности репарации ДНК и работы АТР-зависимых шаперонов.

Окислительное повреждение ДНК затрагивает в основном промоторы генов и теломеры (см. раздел «Теломеры и теломераза»), которые по своей нуклеотидной последовательности более чувствительны к окислительному стрессу (богаты гуанином) и мало способны к восстановлению (не подвергаются транскрипции, сопровождающейся репарацией, или закрыты от репарации в шелтерине соответственно). За счёт такой запрограммированной уязвимости к окислению снижается экспрессия генов, поддерживающих синаптическую пластичность, везикулярный транспорт и митохондриальную функцию, одновременно повышается экспрес-

сия генов стресс-ответа, антиоксидантной защиты и репарации ДНК [25]. Повреждения ДНК и митохондрий усугубляются при недостаточности компенсаторных механизмов, что приводит к формированию положительной обратной связи, гибели клеток и воспалительным процессам [73].

Ковалентные модификации аминокислот в белках меняют поверхностный заряд и топологию, что может приводить к неверному сворачиванию полипептидных цепей или (частичному) разворачиванию уже свёрнутых белков. Окислительный стресс усиливает фосфорилирование тау-белка, сшивку гликопротеинов. Наибольший урон протеостазу наносят модификации шаперонов, которые особенно чувствительны к АФК. Усиление работы антиоксидантных ферментов снижает окислительный стресс и агрегацию белков [74].

Нарушение импорта белков. В митохондриях с пониженным потенциалом (один из признаков старения) нарушается система митохондриального импорта. В результате в цитозоле происходит накопление и агрегация белков, предназначенных для митохондрии [75]. При этом также не может осуществляться защитная функция митохондрий по деградации неправильно свёрнутых цитозольных белков [39]. Некоторые агрегирующие белки, например, мутантный гентингин, могут встраиваться во внешнюю мембрану митохондрии и мешать импорту белка [64]. Это создаёт положительную обратную связь, усугубляющую нарушения протеостаза.

Нефункциональные митохондрии препятствуют асимметричному разделению агрегатов. Митохондрии заякоривают на себе агрегаты (с помощью HSP104), обеспечивая их несимметричное распределение между материнской и дочерней клетками (показано на дрожжах [40]), что нарушается при старении из-за изменения морфологии митохондрий. На культивируемых клетках млекопитающих было показано, что митохондрии связаны с агрегатами (специфический вид контролируемой агрегации неверно свёрнутых белков для аутофагосомной деградации, возникающий при загруженности убиквитин-протеасомной системы), которые неравномерно распределяются во время митоза. Белки, которые образуют агрегаты при некоторых дегенеративных заболеваниях, также связаны с мембраной митохондрий. Хотя эта связь потенциально может помочь ограничить распространение болезнетворных белков, она способствует дисфункции митохондрий [41].

Дисбаланс сигнальной системы. При сбалансированном метаболизме происходит периодическое чередование режимов анаболизма и ката-

болизма, контролируемое переключением между mTORC1 (у млекопитающих, далее для краткости mTOR) и AMPK (рис. 3). Периодическая активация катаболических процессов критически важна для всех неспособных к неограниченному росту многоклеточных организмов, не имеющих возможности для всех клеток снижать количество агрегатов и других нарушений путём деления [76]. При старении из-за хронического избытка питания и низкого использования энергии человеком нарушается периодичность переключения катаболизм—анаболизм, понижается чувствительность сенсоров энергии (AMPK, SIRT1) и питательных веществ (mTOR, IR/IGFR (рецепторов инсулина и инсулиноподобных факторов роста)). Синтез сложных соединений и рост клетки происходят при подавлении стресс-ответов, что приводит ко множеству клеточных дефектов. Рассмотрим, как повреждения метаболизма нарушают протеостаз (рис. 3).

Сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (анаболизм) нарушает протеостаз. Каскад инсулина и инсулиноподобных лигандов (англ. абб. IIS от insulin/insulin-like signaling) состоит из рецептора IGF-1 (DAF-2 у нематод), PI3K (AGE-1) и Akt-белков, консервативен от червей к человеку, ускоряет старение, снижает устойчивость к стрессу и способность поддержания протеостаза (рис. 3). Эффект сигнального каскада определяется инактивацией факторов транскрипции FOXO (DAF-16, контролирующего синтез белков, управляющего продолжительностью жизни клеток, в том числе стресс-ответом), HSF1 (синтез шаперонов), NRF2 (SKN-1, синтез антиоксидантных белков), митохондриальной функции теломеразы TERT (см. раздел «Теломеры и теломеразы»). Нарушение протеостаза определяется также тем, что IIS активирует mTOR (см. ниже) [2].

Ограничение калорий, активация AMPK и SIRT1 (переход на катаболизм) способствуют поддержанию протеостаза. Ограничение рациона питания (сокращение потребления пищи без недоедания) является наиболее действенным вмешательством для увеличения продолжительности жизни и задержки возрастной дисфункции в организмах от дрожжей до млекопитающих. Ограничение калорий напрямую и через AMPK и SIRT1 ингибирует mTOR. AMPK (через отношение AMP/ATP) и SIRT1 (через отношение NAD⁺/NADH) детектируют низкоэнергетическое состояние клетки, являются взаимноактивируемыми. SIRT1 активирует факторы транскрипции стресс-ответа FOXO (DAF-16 у нематод), HSF1 и NRF2 (через PGC-1 α). AMPK (через ингибирование mTOR и активацию

ULK1) и SIRT1 (активируя AMPK, через взаимодействие с PGC-1 α /TFEB) активируют аутофагию. Возрастное снижение чувствительности AMPK и SIRT1 способствует дисрегуляции аутофагии [2].

Подавление анаболических процессов (через ингибирование mTOR) даёт возможность протеканию катаболических процессов (протеасомной и лизосомной деградации). Сенсор достаточности уровня аминокислот mTOR запускает трансляцию, на транскрипционном уровне усиливает биосинтез нуклеиновых кислот, липидов, окислительное фосфорилирование и гликолиз. С другой стороны, mTOR подавляет деградацию белков, органелл и других компонентов клетки (ингибируя TFEB, ULK1). Активность mTOR увеличивается в процессе старения, в том числе из-за хронической избыточности питания при малой активности организма. Длительная активация анаболических систем может приводить к хроническим эндоплазматическому и окислительному стрессам, развитию нейродегенерации и возрастного ожирения. Клетка может противодействовать стрессам за счёт включения ответа на несвёрнутые белки. Блокирование избы-

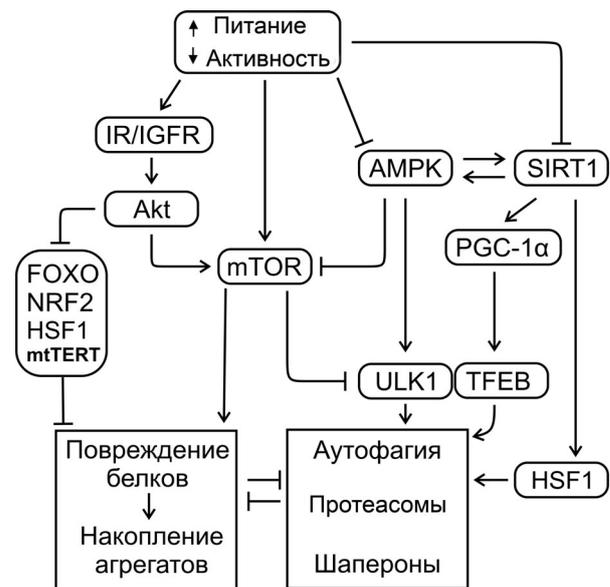


Рис. 3. Дисбаланс сигнальной системы приводит к нарушению протеостаза. Сигнальный каскад инсулина и инсулиноподобных факторов, действуя через ряд звеньев, в том числе IR/IGFR (рецепторы инсулина и инсулиноподобных факторов роста), киназу Akt, активирует mTOR (переводит клетку в режим анаболизма). Киназа Akt подавляет факторы стресс-ответа (FOXO, NRF2, HSF1, митохондриальную функцию теломеразы (mtTERT)). SIRT1, AMPK, детектируя недостаток энергии, определяют переключение метаболизма на катаболизм (ингибируют mTOR), в том числе активируя аутофагию (ULK1, TFEB). Деацетилаза SIRT1 активирует фактор биогенеза митохондрии (PGC-1 α) и факторы стресс-ответа (FOXO, HSF1)

точных анаболических сигналов может быть реализовано в подавлении IIS (отрицательная обратная связь), что может приводить к инсулинорезистентности и развитию диабета 2 типа [77]. В результате инсулинорезистентности может возникнуть гиперинсулинемия, усиливающая окислительный стресс и накопление окисленных белков [78].

Таким образом, подавление mTOR является важным терапевтическим вмешательством для поддержания протеостаза и продления жизни. Рассмотрим возможности сохранения протеостаза через воздействия на метаболическую сигнальную систему клетки.

Активация стресс-ответа независимо от mTOR. Активация транскрипционных факторов FOXO через ингибирование IIS (Akt не фосфорилирует FOXO) и усиление работы SIRT1 (деацетилюет FOXO) индуцирует стресс-ответ, в том числе активирует протеасомную деградацию. Активация сиртуинов может быть достигнута добавлением NAD⁺ (или усилением его синтеза через добавление никотинамидмононуклеотида NMN и активацию никотинамидфосфорибозилтрансферазы NAMPT), что способствует сохранению протеостаза (деацетилирование HSF1 и снижение уровня карбонилирования белков), усилению аутофагии и антиоксидантной защиты [79]. Другим независимым от mTOR способом усиления аутофагии является влияние на сборку фагофора, например, через подавление сигнального пути инозитола (используя препараты лития и карбамазепин), что

позволяет смягчить симптоматику нейродегенеративных заболеваний [80].

Ингибирование mTOR через IIS. При отсутствии сигналов инсулина/IGF1 происходит частичное ингибирование mTOR, подавляется трансляция, усиливается аутофагия и уменьшается количество агрегатов белков. В результате возрастные изменения протеома существенно менее выражены у долгоживущих DAF-2 мутантов *C. elegans*, дефектных по IIS [2]. Однако недостаток АТР может привести к неэффективности аутофагии, поэтому одновременно усиливается контролируемое малыми шаперонами (АТР-независимыми) образование телец включения из префибрилярных олигомеров. Так, под контролем инсулинового каскада реализуется отказоустойчивый защитный механизм поддержания протеостаза [35].

Ингибирование mTOR через SIRT1 и AMPK. При ингибировании хронического анаболизма и активации катаболизма происходит восстановление активности инсулинового каскада, ликвидация гиперинсулиемии. Снижение окислительного стресса и активация аутофагии играют важную роль в восстановлении протеостаза. Это обстоятельство позволяет рассматривать применение сенсibilizаторов инсулина в качестве перспективных стратегий для восстановления протеостаза. Было показано, что ресвератрол (активатор SIRT1) [81] и метформин (активатор AMPK, антидиабетическое средство) обладают нейропротекторными свойствами [82].

Прямое ингибирование mTOR. Ингибирование mTOR может производиться ограничением калорий, а также фармакологически, при помощи рапамицина и ряда других веществ. Рапамицин показал способность увеличивать продолжительность жизни мышей, был применён для усиления аутофагии в *in vivo* моделях болезней Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и других заболеваний. Предпринимаются меры по снижению побочного действия рапамицина для возможности его широкого применения [83].

Изменения генома и эпигенома как причина нарушения протеостаза. ДНК претерпевает изменения с увеличением возраста организма. При этом происходит нарушение стабильности генома, изменение эпигенетического профиля ДНК и укорочение теломер (рис. 4).

Рассмотрим, как изменения генома и эпигенома приводят к нарушению протеостаза.

Генетическая нестабильность: мутации, приводящие к нарушению протеостаза. Нестабильность генома напрямую связана с возрастными протеинопатиями, вызывая наследственные и приобретённые (в большинстве случаев)

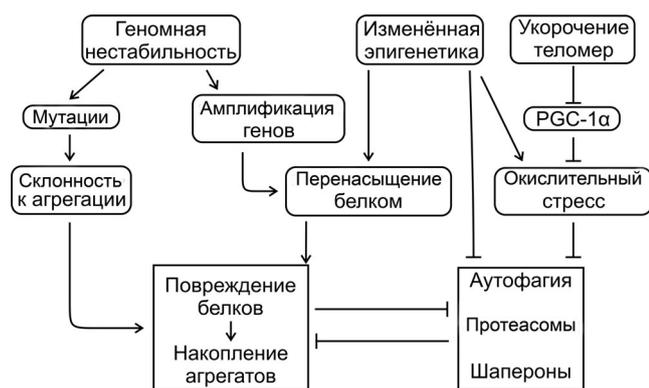


Рис. 4. Изменения генома и эпигенома как причина нарушения протеостаза. Геномная нестабильность увеличивает склонность белка к агрегации и его общую концентрацию. Эпигенетические изменения усиливают окислительный стресс через подавление экспрессии генов ключевых компонентов митохондрий и системы поддержания протеостаза, способствуют повышению экспрессии белков, склонных к агрегации. Укорочение теломер подавляет фактор биогенеза митохондрий PGC-1 α , способствуя окислительному стрессу

формы болезней [3]. Система поддержания протеостаза способствует исправлению или сглаживанию результатов ошибок даже при наличии соответствующих мутаций в геноме. Нарушение защитных механизмов с возрастом объясняет позднее проявление семейных форм протеинопатий [1]. Повреждение генома приводит к ускоренному старению и ряду возрастных заболеваний [2], хотя не все мутации ДНК определяют патологическое изменение белка [84].

Данные крупномасштабного секвенирования указывают на присутствие в человеческой популяции большого количества однонуклеотидных полиморфизмов (точечных замен) (англ. абб. SNP от single nucleotide polymorphism) в областях генома, кодирующих белок, которые должны влиять на его стабильность и сворачивание [85]. Мутации возникают из-за особенностей химической структуры ДНК, неидеальности и ослабления процессов репликации, рекомбинации, репарации при старении, длительной экспозиции организма генотоксичным стрессовым факторам [2]. Особенно подвержен мутациям митохондриальный геном (см. раздел «Нефункциональные митохондрии»). Возрастное увеличение числа подвижных элементов генома (ретробиом, таких как ретротранспозон LINE-1), возникающее из-за иммуносенесцентности [2], также может нарушить структуру генов.

Нестабильность генома приводит к появлению белков, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями. Мутации, меняющие рамку считывания гена (например, PTV – англ. абб. от protein-truncating variant), приводят к появлению дефектных безостановочных, укороченных мРНК. Их трансляция приводит к блокировке рибосом полипептидными цепями, неспособными к сворачиванию, либо к получению усечённой версии белка с неправильным сворачиванием [84]. Для противодействия рибосомальному стрессу существует механизм контроля качества рибосом (англ. абб. RQC от ribosome quality control), нарушения которого связано с возрастной нейродегенерацией [86].

Мутации, дестабилизирующие свёрнутое состояние белка или влияющие на кинетику его сворачивания, приводят к повышению склонности белков к агрегации [87]. Сайленс-мутации (при которых замены аминокислоты в синтезируемом белке не происходит, меняется лишь нуклеотидная последовательность) могут также влиять на процесс трансляции и скорость сворачивания [88]. Мутации антикодона тРНК вызывают замедление трансляции [89]. В результате зарождающаяся полипептидная цепь может занять неверно свёрнутую промежуточную конформацию, ведущую к агрегации белка. Такие метаста-

бильные белки отвлекают на себя компоненты системы поддержания протеостаза. В результате появляются белки (мутантные или неправильно процессированные), приводящие к развитию нейродегенеративных заболеваний [25].

Зачастую увеличение уровня экспрессии выше критической концентрации (мутация в промоторе, амплификация гена), а не наличие патогенных аминокислотных мотивов, служит причиной амилоидных заболеваний. Так, трипликация гена α -синуклеина приводит к наследственной форме болезни Паркинсона [90].

Перспективным способом лечения нейродегенеративных заболеваний, вызванных мутациями в отдельных генах, является антисмысловая РНК-интерференция (подавление трансляции мРНК с мутацией) [3]. Ещё одним перспективным подходом является увеличение внутриклеточной концентрации никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺), который необходим для защиты от окислительного стресса и обеспечения репарации ДНК [79].

Эпигенетические изменения как причина нарушения протеостаза. Существуют свидетельства об эпигенетическом подавлении с возрастом уровня экспрессии фактора транскрипции NRF2 (антиоксидантная защита) [91], шаперонов (HSP70, что способствует развитию болезни Паркинсона [92]), белков аутофагии [93], протеаз, способных к деградации амилоидов [94], ключевых компонентов митохондрий, лизосом и протеасом, что в совокупности способствует нарушению протеостаза [2]. Также возрастные эпигенетические изменения приводят к повышению экспрессии белков, склонных к агрегации [95].

Эпигенетическое репрограммирование способствует восстановлению профиля экспрессии генов, характерного для молодого организма. Контролируемая экспрессия факторов Яманаки достаточна для замедления старения модельных животных и клеточных культур, в том числе для нормализации протеостаза путём активации протеасом и уменьшения окислительного стресса [96].

Было показано, что обработка спермидином вызывает ингибирование гистонацетилацетилтрансфераз и деацетилирование гистона H3 (по лизинам K9, K14, K18), гиперацетилирование которого происходит с возрастом вследствие истощения полиаминов. Изменённый статус ацетилирования хроматина приводит у дрожжей, мух, червей и клеток человека к подавлению окислительного стресса, некроза, значительной активации аутофагии [97].

Гиперэкспрессия SIRT6 через деацетилирование лизина гистона H3K9 подавляет инсули-

новый каскад, способствует переходу на катаболизм и нормализации протеостаза, в том числе в случае ожирения, вызванного диетой [2].

Теломеры и теломераза, стволовые клетки, сенесцентность. Истощение запасов нейрональных стволовых клеток, накопление сенесцентных глиальных клеток, усугубляемое иммуносенесцентностью, вносят важный вклад в патогенез болезней Альцгеймера и Паркинсона [98]. Дисфункция стволовых клеток во многом происходит из-за нарушения активности теломеразы, сенесцентности клеток ниши, то есть из-за укорачивания теломер.

Активация теломеразы улучшает общее состояние организма и увеличивает продолжительность жизни [2]. Обеспечение протеостаза с помощью теломеразы может проходить по двум механизмам. Во-первых, при поддержании длины теломер не уменьшается экспрессия PGC-1 α/β , что способствует рециркуляции митохондрий и снижению окислительного стресса [2]. Во-вторых, неканоническое митохондриальное функционирование теломеразы снижает окислительный стресс. Стоит отметить, что ограничение калорий снижает побочный эффект активации теломеразы (риск развития рака) и, за счёт подавления Akt-киназы, должно усиливать теломеразный антиоксидантный стресс-ответ (см. рис. 3) [99]. Баланс протеостаза способствует активности теломеразы за счёт TRiC/CCT-опосредованной сборки функциональной теломеразы [100].

ВЫВОДЫ

Белковая агрегация является результатом естественной нестабильности, действия протеотоксических стрессов на белки, особенно на те, которые входят в систему поддержания протеостаза. Дисбаланс клеточных процессов и истощение ресурсов для восстановления, происходящие при старении, усиливают нарушения протеостаза.

Увеличивающаяся со старением дисфункция митохондрий вызывает усиление действия внешнего окислительного стресса. При этом работа систем репарации ДНК и защиты белков подавлена недостатком производства АТФ. Преобладание анаболизма над катаболизмом, характерное для старения, негативно сказывается на

протеостазе из-за усиления трансляции, подавления деградации белков и ослабления стресс-ответов. Возрастные изменения генома и эпигенома увеличивают склонность белков к агрегации (мутантные формы и перенасыщение белком), подавляют систему поддержания протеостаза, усиливают окислительный стресс. Нарушения протеостаза в совокупности с дисфункцией митохондрий, дисбалансом сигнальной системы, изменениями генома и эпигенома вызывают истощение запасов стволовых клеток, что на организменном уровне приводит к ослаблению регенерации нейронов и других клеток мозга.

В результате накопления нарушений и, возможно, согласно заложенной программе, наступает дисбаланс появления и удаления агрегатов. Их токсическое взаимодействие с мембранами и включение важных белков в состав агрегатов учащаются и приводят к развитию протеинопатий.

Таким образом, нарушение протеостаза и старение являются взаимосвязанными и взаимоусиливающимися процессами, синергия которых приводит к катастрофическому, нелинейному во времени нарастанию дисфункций организма. Для профилактики протеинопатий важны воздействия, замедляющие старение – хорошая экология, поддержание здорового образа жизни, иммунитета, развитие устойчивости к эмоциональным стрессам, лечение хронических заболеваний (таких как диабет). В целом, показанное воздействие старения на протеостаз подтверждает необходимость поддержания гомеостаза организма для противодействия возрастным заболеваниям и достижения здорового долголетия.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50506.

Благодарности. Ильинский Н. С. выражает благодарность Министерству науки и высшего образования Российской Федерации за поддержку (соглашение № 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taylor, R. C., and Dillin, A. (2011) Aging as an event of proteostasis collapse, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3, a004440, doi: 10.1101/cshperspect.a004440.
2. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, 153, 1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

3. Hipp, M. S., Kasturi, P., and Hartl, F. U. (2019) The proteostasis network and its decline in ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 421-435, doi: 10.1038/s41580-019-0101-y.
4. Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z., and Wolynes, P. G. (1997) Theory of protein folding: the energy landscape perspective, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **48**, 545-600, doi: 10.1146/annurev.physchem.48.1.545.
5. Hartl, F. U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature*, **475**, 324-332, doi: 10.1038/nature10317.
6. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 15-22, doi: 10.1038/nchembio.131.
7. Ellis, R. J., and Minton, A. P. (2006) Protein aggregation in crowded environments, *Biol. Chem.*, **387**, 485-497, doi: 10.1515/BC.2006.064.
8. Vendruscolo, M., Paci, E., Karplus, M., and Dobson, C. M. (2003) Structures and relative free energies of partially folded states of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14817-14821, doi: 10.1073/pnas.2036516100.
9. Wright, C. F., Teichmann, S. A., Clarke, J., and Dobson, C. M. (2005) The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins, *Nature*, **438**, 878-881, doi: 10.1038/nature04195.
10. Gusach, A., Luginina, A., Marin, E., Brouillette, R. L., Besserer-Offroy, E., et al. (2019) Structural basis of ligand selectivity and disease mutations in cysteinyl leukotriene receptors, *Nat. Commun.*, **10**, 5573, doi: 10.1038/s41467-019-13348-2.
11. Walsh, G., and Jefferis, R. (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1241-1252, doi: 10.1038/nbt1252.
12. Tokuriki, N., and Tawfik, D. S. (2009) Protein dynamism and evolvability, *Science*, **324**, 203-207, doi: 10.1126/science.1169375.
13. Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2010) Understanding protein non-folding, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1231-1264, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.017.
14. Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded, *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 131-153, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.12.008.
15. Lang, L., Kurnik, M., Danielsson, J., and Oliveberg, M. (2012) Fibrillation precursor of superoxide dismutase 1 revealed by gradual tuning of the protein-folding equilibrium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 17868-17873, doi: 10.1073/pnas.1201795109.
16. Lindner, A. B., and Demarez, A. (2009) Protein aggregation as a paradigm of aging, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 980-996, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.06.005.
17. Coppedè, F., Mancuso, M., Siciliano, G., Migliore, L., and Murri, L. (2006) Genes and the environment in neurodegeneration, *Biosci. Rep.*, **26**, 341-367, doi: 10.1007/s10540-006-9028-6.
18. Golubev, A., Hanson, A. D., and Gladyshev, V. N. (2017) Non-enzymatic molecular damage as a prototypic driver of aging, *J. Biol. Chem.*, **292**, 6029-6038, doi: 10.1074/jbc.R116.751164.
19. Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449-10453, doi: 10.1073/pnas.89.21.10449.
20. Kim, Y. E., Hosp, F., Frottin, F., Ge, H., Mann, M., et al. (2016) Soluble oligomers of PolyQ-expanded huntingtin target a multiplicity of key cellular actors, *Mol. Cell*, **63**, 951-964, doi: 10.1016/j.molcel.2016.07.022.
21. Guo, Q., Lehmer, C., Martínez-Sánchez, A., Rudack, T., Beck, F., et al. (2018) *In situ* structure of neuronal C9orf72 Poly-GA aggregates proteasome recruitment, *Cell*, **172**, 696-705.e12, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.030.
22. Olzscha, H., Schermann, S. M., Woerner, A. C., Pinkert, S., Hecht, M. H., et al. (2011) Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions, *Cell*, **144**, 67-78, doi: 10.1016/j.cell.2010.11.050.
23. Anguiano, M., Nowak, R. J., and Lansbury, P. T., Jr. (2002) Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes, *Biochemistry*, **41**, 11338-11343, doi: 10.1021/bi020314u.
24. Milanese, L., Sheynis, T., Xue, W.-F., Orlova, E. V., Hellewell, A. L., et al. (2012) Direct three-dimensional visualization of membrane disruption by amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 20455-20460, doi: 10.1073/pnas.1206325109.
25. Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*, **443**, 787-795, doi: 10.1038/nature05292.
26. Tsigelny, I. F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G. M., Sharikov, Y., et al. (2008) Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases, *PLoS One*, **3**, e3135, doi: 10.1371/journal.pone.0003135.
27. Klaips, C. L., Jayaraj, G. G., and Hartl, F. U. (2018) Pathways of cellular proteostasis in aging and disease, *J. Cell Biol.*, **217**, 51-63, doi: 10.1083/jcb.201709072.
28. Dikic, I. (2017) Proteasomal and autophagic degradation systems, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 193-224, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.
29. Tartaglia, G. G., Pechmann, S., Dobson, C. M., and Vendruscolo, M. (2007) Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 204-206, doi: 10.1016/j.tibs.2007.03.005.
30. Ciryam, P., Tartaglia, G. G., Morimoto, R. I., Dobson, C. M., and Vendruscolo, M. (2013) Widespread aggregation and neurodegenerative diseases are associated with supersaturated proteins, *Cell Rep.*, **5**, 781-790, doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.043.
31. Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease, *Cell*, **101**, 57-66, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80623-6.
32. Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T., and Thiele, D. J. (2018) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 4-19, doi: 10.1038/nrm.2017.73.
33. Behrends, C., Langer, C. A., Boteva, R., Böttcher, U. M., Stemp, M. J., et al. (2006) Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers, *Mol. Cell*, **23**, 887-897, doi: 10.1016/j.molcel.2006.08.017.
34. Brehme, M., Voisine, C., Rolland, T., Wachi, S., Soper, J. H., et al. (2014) A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease, *Cell Rep.*, **9**, 1135-1150, doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.042.
35. Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R. M., Kelly, J. W., and Dillin, A. (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity, *Science*, **313**, 1604-1610, doi: 10.1126/science.1124646.
36. Walker, G. A., and Lithgow, G. J. (2003) Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals, *Aging Cell*, **2**, 131-139, doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00045.x.
37. Hetz, C., and Papa, F. P. (2018) The unfolded protein response and cell fate control, *Mol. Cell*, **69**, 169-181, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
38. Shpilka, T., and Haynes, C. M. (2018) The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implica-

- tions in ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 109-120, doi: 10.1038/nrm.2017.110.
39. Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., et al. (2017) Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria, *Nature*, **543**, 443-446, doi: 10.1038/nature21695.
 40. Miller, S. B. M., Mogk, A., and Bukau, B. (2015) Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy, *J. Mol. Biol.*, **427**, 1564-1574, doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.006.
 41. Moore, D. L., Pilz, G. A., Araúz-Bravo, M. J., Barral, Y., and Jessberger, S. (2015) A mechanism for the segregation of age in mammalian neural stem cells, *Science*, **349**, 1334-1338, doi: 10.1126/science.aac9868.
 42. Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., Ecroyd, H., and Wilson, M. R. (2013) Extracellular chaperones and proteostasis, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 295-322, doi: 10.1146/annurev-biochem-072711-163904.
 43. Wilkinson, B., and Gilbert, H. F. (2004) Protein disulfide isomerase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1699**, 35-44, doi: 10.1016/j.bbapap.2004.02.017.
 44. Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., and Nicholson, L. K. (2007) Prolyl *cis-trans* isomerization as a molecular timer, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 619-629, doi: 10.1038/nchembio.2007.35.
 45. Min, J.-N., Whaley, R. A., Sharpless, N. E., Lockyer, P., Portbury, A. L., and Patterson, C. (2008) CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 4018-4025, doi: 10.1128/mcb.00296-08.
 46. Calamini, B., Silva, M. C., Madoux, F., Hutt, D. M., Khanna, S., et al. (2012) Small molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 185-196, doi: 10.1038/nchembio.763.
 47. Walthers, D. M., Kasturi, P., Zheng, M., Pinkert, S., Vecchi, G., et al. (2015) Widespread proteome remodeling and aggregation in aging *C. elegans*, *Cell*, **161**, 919-932, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.032.
 48. Moreno, J. A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., et al. (2013) Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 206ra138, doi: 10.1126/scitranslmed.3006767.
 49. Alberti, S., and Hyman, A. A. (2016) Are aberrant phase transitions a driver of cellular aging? *Bioessays*, **38**, 959-968, doi: 10.1002/bies.201600042.
 50. Esser, C., Alberti, S., and Höhfeld, J. (2004) Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system, *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 171-188, doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.020.
 51. Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., et al. (2017) Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities, *Neuron*, **93**, 1015-1034, doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.022.
 52. Kitamura, A., Inada, N., Kubota, H., Matsumoto, G., Kinjo, M., et al. (2014) Dysregulation of the proteasome increases the toxicity of ALS-linked mutant SOD1, *Genes Cells*, **19**, 209-224, doi: 10.1111/gtc.12125.
 53. Parkitko, A. A., Favorova, O. O., and Henske, E. P. (2013) Autophagy: mechanisms, regulation, and its role in tumorigenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 355-367.
 54. Carmona-Gutierrez, D., Hughes, A. L., Madeo, F., and Ruckenstein, C. (2016) The crucial impact of lysosomes in aging and longevity, *Ageing Res. Rev.*, **32**, 2-12, doi: 10.1016/j.arr.2016.04.009.
 55. Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., and Björklund, A. (2013) TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E1817-1826, doi: 10.1073/pnas.1305623110.
 56. Xilouri, M., Brekk, O. R., Landeck, N., Pitychoutis, P. M., Papanikolaou, T., et al. (2013) Boosting chaperone-mediated autophagy *in vivo* mitigates α -synuclein-induced neurodegeneration, *Brain*, **136**, 2130-2146, doi: 10.1093/brain/awt131.
 57. Leeman, D. S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A. E., McKay, A., et al. (2018) Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging, *Science*, **359**, 1277-1283, doi: 10.1126/science.aag3048.
 58. Vilchez, D., Boyer, L., Morante, I., Lutz, M., Merkwirth, C., et al. (2012) Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11, *Nature*, **489**, 304-308, doi: 10.1038/nature11468.
 59. Noormohammadi, A., Khodakarami, A., Gutierrez-Garcia, R., Lee, H. J., Koyuncu, S., et al. (2016) Somatic increase of CCT8 mimics proteostasis of human pluripotent stem cells and extends *C. elegans* lifespan, *Nat. Commun.*, **7**, 13649, doi: 10.1038/ncomms13649.
 60. Shelkownikova, T. A., Kulikova, A. A., Tsvetkov, F. O., Peters, O., Bachurin, S. O., et al. (2012) Proteinopathies, neurodegenerative disorders with protein aggregation-based pathology, *Mol. Biol.*, **46**, 362-374.
 61. Angelova, P. R., and Abramov, A. Y. (2017) Alpha-synuclein and beta-amyloid – different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **483**, 1110-1115, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.103.
 62. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Horrocks, M. H., Choi, M. L., Rodrigues, M., et al. (2018) α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease, *Nat. Commun.*, **9**, 2293, doi: 10.1038/s41467-018-04422-2.
 63. Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A., and Wolozin, B. (2003) Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function, *J. Biol. Chem.*, **278**, 11753-11759, doi: 10.1074/jbc.M208641200.
 64. Orr, A. L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., et al. (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking, *J. Neurosci.*, **28**, 2783-2792, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0106-08.2008.
 65. Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 301-307, doi: 10.1038/nrm2873.
 66. Ozawa, T. (1997) Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging, *Physiol. Rev.*, **77**, 425-464, doi: 10.1152/physrev.1997.77.2.425.
 67. Lee, H.-C., Yin, P.-H., Chi, C.-W., and Wei, Y.-H. (2002) Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence, *J. Biomed. Sci.*, **9**, 517-526, doi: 10.1007/BF02254978.
 68. Bernhardt, D., Müller, M., Reichert, A. S., and Osiewacz, H. D. (2015) Simultaneous impairment of mitochondrial fission and fusion reduces mitophagy and shortens replicative lifespan, *Sci. Rep.*, **5**, 7885, doi: 10.1038/srep07885.
 69. Labbadia, J., Brielmann, R. M., Neto, M. F., Lin, Y.-F., Haynes, C. M., and Morimoto, R. I. (2017) Mitochondrial stress restores the heat shock response and prevents proteostasis collapse during aging, *Cell Rep.*, **21**, 1481-1494, doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.038.
 70. Thomas, H. E., Zhang, Y., Stefely, J. A., Veiga, S. R., Thomas, G., et al. (2018) Mitochondrial complex I activity is required for maximal autophagy, *Cell Rep.*, **24**, 2404-2417.e8, doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.101.

71. Brunk, U. T., and Terman, A. (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1996–2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x.
72. Park, J. T., Lee, Y.-S., Cho, K. A., and Park, S. C. (2018) Adjustment of the lysosomal-mitochondrial axis for control of cellular senescence, *Ageing Res. Rev.*, **47**, 176–182, doi: 10.1016/j.arr.2018.08.003.
73. Nesterov, S. V., Yaguzhinsky, L. S., Podoprighora, G. I., and Nartsissov, Ya. R. (2018) Autocatalytic cycle in the pathogenesis of diabetes mellitus: biochemical and pathophysiological aspects of metabolic therapy with natural amino acids in the example of glycine, *Diabetes Mellitus*, **21**, 283–292, doi: 10.14341/DM9529.
74. Korovila, I., Hugo, M., Castro, J. P., Weber, D., Höhn, A., et al. (2017) Proteostasis, oxidative stress and aging, *Redox Biol.*, **13**, 550–567, doi: 10.1016/j.redox.2017.07.008.
75. Wrobel, L., Topf, U., Bragoszewski, P., Wiese, S., Sztolsztemer, M. E., et al. (2015) Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol, *Nature*, **524**, 485–488, doi: 10.1038/nature14951.
76. Nesterov, S. V., Yaguzhinsky, L. S., Podoprighora, G. I., and Nartsissov, Ya. R. (2020) Amino acids as regulators of cell metabolism, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 393–408, doi: 10.1134/S000629792004001X.
77. Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, **306**, 457–461, doi: 10.1126/science.1103160.
78. Anisimov, V. N. (2003) Insulin/IGF-1 signaling pathway driving aging and cancer as a target for pharmacological intervention, *Exp. Gerontol.*, **38**, 1041–1049, doi: 10.1016/s0531-5565(03)00169-4.
79. Oka, S.-I., Hsu, C.-P., and Sadoshima, J. (2012) Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides, *Circ. Res.*, **111**, 611–627, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247932.
80. Sarkar, S. (2013) Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1103–1130, doi: 10.1042/BST20130134.
81. Wu, Y., Li, X., Zhu, J. X., Xie, W., Le, W., et al. (2011) Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease, *Neurosignals*, **19**, 163–174, doi: 10.1159/000328516.
82. Anisimov, V. N., Semenchenko, A. V., and Yashin, A. I. (2003) Insulin and longevity: antidiabetic biguanides as geroprotectors, *Biogerontology*, **4**, 297–307, doi: 10.1023/a:1026299318315.
83. Martinez-Vicente, M. (2015) Autophagy in neurodegenerative diseases: from pathogenic dysfunction to therapeutic modulation, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **40**, 115–126, doi: 10.1016/j.semcdb.2015.03.005.
84. Kosmicki, J. A., Samocha, K. E., Howrigan, D. P., Sanders, S. J., Slowikowski, K., et al. (2017) Refining the role of de novo protein-truncating variants in neurodevelopmental disorders by using population reference samples, *Nat. Genet.*, **49**, 504–510, doi: 10.1038/ng.3789.
85. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., et al. (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans, *Nature*, **536**, 285–291, doi: 10.1038/nature19057.
86. Choe, Y.-J., Park, S.-H., Hassemer, T., Körner, R., Vincenz-Donnelly, L., et al. (2016) Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress, *Nature*, **531**, 191–195, doi: 10.1038/nature16973.
87. Boucher, J. I., Bolon, D. N. A., and Tawfik, D. S. (2016) Quantifying and understanding the fitness effects of protein mutations: laboratory versus nature, *Protein Sci.*, **25**, 1219–1226, doi: 10.1002/pro.2928.
88. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., et al. (2007) A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity, *Science*, **315**, 525–528, doi: 10.1126/science.1135308.
89. Nedialkova, D. D., and Leidel, S. A. (2015) Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity, *Cell*, **161**, 1606–1618, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.022.
90. Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., et al. (2003) alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science*, **302**, 841, doi: 10.1126/science.1090278.
91. Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Zazueta, C., and Königsberg, M. (2018) Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging, *Ageing Res. Rev.*, **47**, 31–40, doi: 10.1016/j.arr.2018.06.003.
92. Harries, L. W. (2014) MicroRNAs as mediators of the ageing process, *Genes (Basel)*, **5**, 656–670, doi: 10.3390/genes5030656.
93. Lapiere, L. R., Kumsta, C., Sandri, M., Ballabio, A., and Hansen, M. (2015) Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging, *Autophagy*, **11**, 867–880, doi: 10.1080/15548627.2015.1034410.
94. Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., Kerridge, C., and Turner, A. J. (2014) Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 235, doi: 10.3389/fnagi.2014.00235.
95. Konsoula, Z., and Barile, F. A. (2012) Epigenetic histone acetylation and deacetylation mechanisms in experimental models of neurodegenerative disorders, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **66**, 215–220, doi: 10.1016/j.vascn.2012.08.001.
96. Sarkar, T. J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., et al. (2020) Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells, *Nat. Commun.*, **11**, 1545, doi: 10.1038/s41467-020-15174-3.
97. Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckstuhl, C., et al. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1305–1314, doi: 10.1038/ncb1975.
98. Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., and Baker, D. J. (2018) Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline, *Nature*, **562**, 578–582, doi: 10.1038/s41586-018-0543-y.
99. Rosen, J., Jakobs, P., Ale-Agha, N., Altschmied, J., and Haendeler, J. (2020) Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase – impact on redox homeostasis, *Redox Biol.*, **34**, 101543, doi: 10.1016/j.redox.2020.101543.
100. Freund, A., Zhong, F. L., Venteicher, A. S., Meng, Z., Veenstra, T. D., et al. (2014) Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1, *Cell*, **159**, 1389–1403, doi: 10.1016/j.cell.2014.10.059.

**ON THE ROLE OF NORMAL AGING PROCESSES IN THE EMERGENCE
AND PATHOGENESIS OF THE DISEASES ASSOCIATED
WITH THE ABNORMAL ACCUMULATION OF PROTEIN AGGREGATES**

Review

**N. S. Ilyinsky^{1*}, S. V. Nesterov^{1,2}, E. I. Shestoperova¹,
A. V. Fonin^{1,3}, V. N. Uversky^{1,4}, and V. I. Gordeliy^{1,5,6}**

¹ *Research Center for Molecular Mechanisms of Aging and Age-related Diseases,
Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny,
Moscow Region, Russia; E-mail: ilinsky_nick@mail.ru*

² *Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, 115404 Moscow, Russia*

³ *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 Saint-Petersburg, Russia*

⁴ *Morsani College of Medicine, University of South Florida, 33612 Tampa, USA*

⁵ *Forschungszentrum Juelich, 52428 Juelich, Germany*

⁶ *Institut de biologie structurale, 38000 Grenoble, France*

Aging is a prime systemic cause of various age-related diseases, in particular, proteinopathies. In fact, most diseases associated with protein misfolding are sporadic, and their incidence increases with aging. This review examines the process of protein aggregate formation, the toxicity of such aggregates, the organization of cellular systems involved in proteostasis, and the impact of protein aggregates on important cellular processes leading to proteinopathies. We also analyze how manifestations of aging (mitochondrial dysfunction, dysfunction of signaling systems, changes in the genome and epigenome) facilitate pathogenesis of various proteinopathies either directly, by increasing the propensity of key proteins for aggregation, or indirectly, through dysregulation of stress responses. Such analysis might help in outlining approaches for treating proteinopathies and extending healthy longevity.

Keywords: proteostasis, protein aggregation, proteinopathy, aging, mitochondrial dysfunction, mutations, epigenetic changes

УДК 571.27

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ. НОВЫЕ ДАННЫЕ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Обзор

© 2021 И.П. Шиловский*, К.В. Юмашев, А.А. Никольский,
Л.И. Вишнякова, М.Р. Хаитов

Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ip.shilovskiy@nrcki.ru

Поступила в редакцию 29.07.2020

После доработки 18.10.2020

Принята к публикации 18.10.2020

Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) может вызывать тяжёлые инфекции нижних дыхательных путей у младенцев, людей с ослабленным иммунитетом и пожилых людей. Несмотря на десятилетия исследований этого патогена, отсутствует одобренная для медицинского применения профилактическая вакцина, а многие терапевтические средства все ещё находятся на различных стадиях разработки. Ускорить создание средств профилактики и лечения может детальное раскрытие механизмов патогенеза РСВ-инфекции. Патогенез этого заболевания изучают с использованием клинического материала от пациентов, однако детальные представления о молекулярных и клеточных механизмах патогенеза получают, используя модели РСВ-инфекции на животных. Чаще всего в качестве модельного вида используют мышей, т.к. они позволяют воспроизвести основные проявления патологии (обструкция бронхов, гиперсекреция слизи и воспаление лёгких, опосредованное лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами). Кроме того, их использование экономически целесообразно, а также доступен широкий спектр молекулярно-биологического инструментария, позволяющего изучать механизмы патогенеза на клеточном и молекулярном уровнях. В данном обзоре обобщены новые данные о патогенезе РСВ-инфекции, полученные с использованием моделей на мышах. На этих моделях показана роль Т-клеток как в антивирусной защите, так и в развитии иммунопатологии лёгких. Т-клетки осуществляют элиминацию инфицированных клеток, они же продуцируют значительные количества провоспалительных цитокинов TNF α и IFN γ . Недавно была выявлена новая популяция тканерезидентных Т-клеток памяти (T_{RM}). Они обладают выраженным антивирусным эффектом, при этом не вызывают иммунопатологии лёгких. Накопление T_{RM} происходит после локального (а не системного) введения РСВ-антигенов. Этот факт может быть в дальнейшем использован при разработке эффективных подходов к вакцинации. Также с использованием моделей на мышах показана незначительная роль интерферонов в антивирусной защите от РСВ. Этот патоген обладает механизмами «ухода» от действия антивирусных интерферонов типа I и III, что может объяснять низкую эффективность интерферон-содержащих лекарственных препаратов по отношению к РСВ. Благодаря технологии нокаута генов у лабораторных мышей был совершён значительный прорыв в понимании роли ряда провоспалительных цитокинов в иммунопатологии лёгких. Помимо TNF α и IFN γ , было установлено, что цитокины IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-33 и TSLP опосредуют основные проявления патологии: обструкцию бронхов, продукцию слизи, инфильтрацию лёгких провоспалительными клетками. В то же время IL-6, IL-10 и IL-27 оказывали благоприятный эффект. Несмотря на значительные отличия в иммунной системе лабораторных мышей и человека, экспериментальные модели на этих животных внесли существенный вклад в раскрытие молекулярных и клеточных механизмов патогенеза РСВ-инфекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярные механизмы, респираторно-синцициальный вирус, патогенез, экспериментальные модели.

DOI: 10.31857/S0320972521030052

ВВЕДЕНИЕ

Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) относится к порядку Mononegavirales, семей-

ству Pneumoviridae, роду *Orthopneumovirus*. РСВ – один из самых распространённых патогенов [1], вызывающих тяжёлые заболевания верхних и нижних дыхательных путей у де-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ГРБ – гиперреактивность бронхов; ДК – дендритные клетки; мАт – моноклональные антитела; миРНК – малые интерферирующие РНК; РСВ – респираторно-синцициальный вирус; Treg – Т-регуляторные клетки; T_{RM} – тканерезидентные Т-клетки памяти; HSGAG – гепарансульфаты (heparan sulfate); pfu – бляшкообразующие единицы (plaque-forming units).

* Адресат для корреспонденции.

тей [2], пожилых людей [3] и пациентов с иммунодефицитами [4]. Пациенты с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью лёгких также в значительной степени страдают от этой инфекции [5]. Ежегодно в мире госпитализируется до 3 млн детей, инфицированных РСВ, при этом смертность от этой инфекции составляет 66–199 тыс. [6]. Экономический ущерб от РСВ-инфекции (по данным в США) оценивается в 1,15 млрд долларов [7].

К настоящему времени не создано эффективной вакцины против РСВ [8], а для иммунопрофилактики применяют препараты на основе моноклональных антител (мАт), широкое использование которых ограничено высокой стоимостью [9]. Тем не менее продолжается разработка новых вакцин; на различных стадиях клинических исследований находятся 16 кандидатных вакцин, 6 из них – на стадии II [10]. Учитывая эти факты, в ближайшие несколько лет можно ожидать появление на рынке зарегистрированной профилактической вакцины от РСВ.

Ведутся работы над созданием терапевтических средств, например ингибиторов вируса на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) [11], наночастиц [12], пептидных соединений [13] и других малых молекул [14]. Одним из перспективных направлений в разработке анти-РСВ-терапии является применение молекул миРНК, которые сиквенс-специфично взаимодействуют с жизненно важными генами вируса и тем самым блокируют его репликацию. На таком принципе работает препарат ALN-RSV01, в котором в качестве действующего вещества выступают молекулы миРНК против гена *n*, кодирующего компонент нуклеокапсиды вируса. Проведённые клинические исследования показали, что интраназальный приём ALN-RSV01 в течение 5 суток статистически значимо снижал число добровольцев с диагностированной РСВ-инфекцией на 38% [15]. Несмотря на положительные результаты проведённых исследований, компания «Anylam Pharmaceuticals» остановила испытания ALN-RSV01, поэтому невозможно спрогнозировать, когда будет зарегистрирован данный препарат.

Для создания эффективных и безопасных средств лечения и профилактики необходима информация о молекулярных и клеточных механизмах патогенеза РСВ-инфекции, получение которой невозможно без разработки адекватных экспериментальных моделей заболевания на животных. К настоящему времени создано множество моделей РСВ-инфекции на различных животных: мыши, крысы, хорьки, телята, овцы, шимпанзе и другие [16, 17]. Несмотря на то что

шимпанзе – это единственный вид животных, природно-восприимчивый к РСВ человека, чаще всего в качестве модельного вида применяют мышей [16, 17] ввиду простоты и дешевизны их использования, а также по причине доступности значительного количества научного инструментария (моноклональные антитела (мАт), зонды, специализированные реагенты и оборудование), позволяющего детально раскрыть механизмы патогенеза. В данном обзоре будут обобщены новые данные о патогенезе РСВ-инфекции, полученные с использованием моделей на мышах.

СТРУКТУРА РСВ И ЕГО ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ

Геном РСВ представлен одноцепочечной несегментированной молекулой РНК негативной полярности, несущей 10 генов, которые кодируют 11 белков: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 и L (ген *M* кодирует два белка M2-1 и M2-2). Геномная РНК инкапсулирована в нуклеокапсид, состоящий из белка N, РНК-полимеразы (белка L) и его кофактора (белка P), а также белка M2-1. Белок M окружает нуклеокапсид и при этом взаимодействует с липидным бислоем – оболочкой вириона и цитоплазматическим доменом белка F. В оболочку РСВ включены гликопротеины: белок слияния F, белок G и малый гидрофобный белок SH. Белок M2-2 и два неструктурных белка (NS1 и NS2) отсутствуют в составе вириона [18].

Жизненный цикл РСВ начинается с этапа прикрепления вириона к клетке-мишени с последующим слиянием мембран вируса и клетки. В этом процессе центральную роль играют поверхностные гликопротеины F и G. Белок G существует в двух формах; мембранная форма осуществляет прикрепление вириона к клетке благодаря связыванию с рецепторами или факторами прикрепления на их поверхности. Стоит отметить, что в последних работах поверхностные белки клеток-мишеней, связывающихся с белком G, называют не рецепторами, а факторами прикрепления, к рецепторам относятся белки клеток, которые иницируют процесс слияния вириона и клетки [13, 18]. Растворимая форма (sG) функционирует как антигенная «ловушка» для связывания анти-G-антител, она необходима для «ухода» вируса от иммунной системы организма [19].

Одни из самых изученных факторов прикрепления – это гепарансульфаты (HSGAG), относящиеся к гликозаминогликанам (GAG) и представляющие собой дисахаридные полиме-

ры, связанные с трансмембранными белками на поверхности многих типов клеток. Взаимодействие с HSGAG реализуется за счёт электростатического связывания позитивно заряженного гепарин-связывающего домена белка G с отрицательно заряженными HSGAG [20]. Идентифицированы и другие факторы прикрепления, например хемокиновый рецептор CX3CR1, который связывается с мотивом CX3C белка G [21]. Белок F также способен участвовать в прикреплении за счёт связывания с такими факторами, как HSGAG [22], ICAM1 [23], EGFR [24] и nucleolin [25], причём последний может функционировать не только как фактор прикрепления, но и как рецептор [25].

Несмотря на то, что белок F участвует в прикреплении, главная его функция – это слияние мембран вируса и клетки. Данный гликопротеин синтезируется инфицированной клеткой в виде белка-предшественника (F0), который протеолитически расщепляется на субъединицы F1 и F2, связанные ковалентно в гетеродимер. На поверхности вириона функциональный белок F существует в виде тримера F1/F2-гетеродимеров в префузионной конформации. На N-конце субъединицы F1 располагается пептид слияния (FP) с прилегающим к нему α -спиральным участком HR-N. На C-конце F1 располагается трансмембранный домен (TM) с α -спиральным участком HR-C, который обеспечивает закоревание белка в оболочке вируса. В процессе слияния пептид FP взаимодействует с мембраной клетки-мишени, после чего белок F меняет свою конформацию с префузионной на постфузионную. В ходе этой реорганизации участки HR-C и HR-N белка F сближаются, формируя шпильчатую структуру, что приводит к сближению мембран клетки и вириона, и в итоге к их слиянию. Согласно последним данным, слияние вириона с клеткой – это двухстадийный процесс: первоначально происходит макропиноцитоз, а затем непосредственно слияние мембран внутри эндосомы [13, 18]. Гликопротеин SH не имеет существенного значения в процессах прикрепления и слияния [13, 18].

В результате слияния геном вируса проникает в цитоплазму клетки, где происходит транскрипция мРНК и трансляция его белков. В репликации генома участвуют три белка: N, P и L. Белки P и L – это субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы, а белок N, связываясь с геномной РНК, защищает её от нуклеаз клетки. Транскрипция мРНК осуществляется тем же ферментом, что и репликация геномной РНК [26].

В сборку вирионов вовлечён актиновый цитоскелет клетки, который транспортирует гли-

копротеины вируса (белки F, G и SH) к апикальной поверхности мембраны клетки. Одновременно белок N связывается с заново синтезированной геномной РНК вируса и РНК-зависимой РНК-полимеразой (белками L и P), формируя рибонуклеопротеиновый комплекс, который дополнительно ассоциируется с белком M, и затем также транспортируется к апикальной поверхности мембраны клетки – месту локализации гликопротеинов. В результате образуются вирусные частицы, которые отпочковываются от клетки-мишени в виде сформированных инфекционных вирионов [13, 18].

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ПРИ РСВ-ИНФЕКЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

РСВ поражает верхние и нижние дыхательные пути человека. Инфицирование происходит за счёт прямого контакта вирусосодержащих частиц с эпителием респираторного тракта. Первоначально репликация вируса протекает в эпителии носоглотки после инкубационного периода (4–5 дней) с последующим распространением патогена в нижние дыхательные пути. При этом тяжесть патологии значительно варьирует от слабых симптомов ОРВИ вплоть до обструкции дыхательных путей, гипоксии и пневмонии [27].

Вирус преимущественно реплицируется в реснитчатом эпителии дыхательных путей и альвеолярных пневматоцитах типа I и II [28]. Сведения о гистологических изменениях респираторного тракта были получены при анализе образцов лёгких от пациентов, погибших в результате тяжёлой РСВ-инфекции. Данные изменения характеризовались периваскулярной и перибронхиальной инфильтрацией мононуклеарами и T-клетками, признаками пневмонии, некроза эпителия бронхиол, закупоркой просвета бронхиол конгломератами клеток (слищающимися эпителиальными клетками, макрофагами и нейтрофилами), гиперсекрецией слизи [28]. При этом CD4⁺- и CD8⁺-лимфоциты обнаруживались в дыхательных путях редко [29]. Анализ образцов бронхоальвеолярного лавжа (БАЛ), полученных от детей с РСВ-индуцированным бронхиолитом, выявил значительное количество нейтрофилов [30]. Также в образцах БАЛ выявлено значительное количество провоспалительных факторов: TNF α , IL-6, IL-1 α , IL-8, MIP-1 α , MCP-1, RANTES, IFN γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-9 и IL-17 [31, 32]. Активация вышеуказанных провоспалительных факторов вносит вклад в патогенез РСВ-инфекции.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ РСВ-ИНФЕКЦИЙ

Помимо клинического материала от пациентов с РСВ-инфекцией, для изучения патогенеза этого заболевания применяют модели на животных. Моделирование осуществляют на таких видах животных, как мыши, крысы, хорьки, телята, овцы и другие [16, 17]. Главным ограничением в использовании этих видов является то, что они частично чувствительны к РСВ, т.е. вирус плохо реплицируется в дыхательных путях, вследствие чего признаки патологии слабо выражены. Шимпанзе — это единственный вид животных, природно-восприимчивый к РСВ человека [16, 17]. Широкое использование шимпанзе в качестве модельного организма ограничено значительными издержками на их содержание, поэтому наиболее часто для моделирования РСВ-инфекции используют грызунов, в частности мышей. Значительное количество данных о молекулярных и клеточных механизмах патогенеза РСВ было получено именно с использованием мышей. Чаще всего применяют мышей линии BALB/c, т.к. вирус способен реплицироваться (хотя и ограниченно) в их респираторном тракте (таблица), причём у возрастных мышей репликация вируса и признаки патологии более выражены [33]. В большинстве опубликованных работ мышей заражают интраназально вирусом в дозах 10^4 – 10^7 pfu (plaque-forming units — бляшкообразующие единицы) на мыш. Дозы 10^6 pfu, чаще всего, достаточно для индукции выраженных проявлений патологии (гиперсекреция слизи, инфильтрация провоспалительными клетками ткани лёгких и другие). В большинстве работ используют три лабораторных штамма РСВ: *A2*, *line 19* и *long*, однако в некоторых исследованиях животных инфицировали клиническими изолятами, полученными от пациентов (таблица) [34].

Первые работы по моделированию РСВ-инфекции у мышей были опубликованы в конце 70-х [35]—начале 80-х гг. [36, 37]. В самом первом исследовании Prince et al. [35] изучали способность вируса реплицироваться в дыхательных путях мышей. Двадцать линий мышей инфицировали РСВ (штаммом *long*) в дозе $\sim 10^4$ pfu. Наиболее резистентными к репликации вируса оказались мыши линии CBA/CaHN, а наиболее чувствительной — линия DBA/2N. Линия BALB/c имела промежуточную чувствительность к данному штамму вируса. Показав способность РСВ к репродукции в дыхательных путях мышей, авторы не исследовали то, какие патологические изменения в дыхательных путях происходили в ходе инфекции (таблица) [35].

Несколько лет спустя двумя независимыми коллективами [36, 37] была подтверждена способность РСВ (штамм *A2*) инфицировать верхние и нижние дыхательные пути мышей (BALB/c) с пиком репродукции вируса в период 4–6 дней после заражения. Дополнительно авторы показали, что размножение вируса происходит в основном в эпителии альвеол (но не бронхов) и приводит к патологическим изменениям респираторного тракта (инфильтрации лёгких лимфоцитами и макрофагами, утолщению стенки бронхиол и слушиванию респираторного эпителия) (таблица) [36, 37]. В более поздней работе [38] с применением рекомбинантных штаммов РСВ (*rHRSV-Cherry* и *rHRSV-Luc*), несущих репортерные гены, была прижизненно визуализирована репликация вируса в респираторном тракте мышей. Это исследование подтвердило, что пик репродукции РСВ в нижних дыхательных путях приходится на 4–5 сутки после инфекции, при этом вирус поражает оба лёгких в одинаковой степени (таблица) [38].

Длительное время оставался спорным вопрос о влиянии РСВ-инфекции на развитие гиперреактивности бронхов (ГРБ). Jafri et al. [39] одними из первых показали, что РСВ в высокой дозе ($\sim 10^7$ pfu) способен вызывать ГРБ у мышей, которая достигала пика на 5-й день после инфекции и сохранялась более 40 суток. По мнению авторов, ГРБ возникала как результат гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием и инфильтрации лёгких провоспалительными клетками (лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами), которые детектировались в течение 150 дней после инфекции. При этом авторы не выявили корреляции между ГРБ и вирусной нагрузкой в лёгких (таблица) [39]. Год спустя Vitko et al. [40] подтвердили способность РСВ в дозе 10^7 pfu вызывать у мышей ГРБ. В своём исследовании авторы связывают развитие ГРБ с повышением продукции лейкотриенов, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности гладкой мускулатуры бронхов и вызывают «бронхоконструкцию». Кроме того, лейкотриены провоцируют гиперсекрецию слизи эпителием респираторного тракта, что также вносит вклад в ГРБ (таблица) [40].

Выраженную ГРБ и гиперсекрецию слизи способны вызывать не все штаммы РСВ. Показано, что штамм *line 19* был более мукогенным и вызывал значительную ГРБ даже в дозе 10^4 pfu. Кроме того, этот штамм активировал продукцию IL-13, который ответственен за развитие ГРБ и гиперсекрецию слизи, в то же время нокаут гена *IL-13* нивелировал вышеуказанные признаки (таблица) [41]. Эти результаты были

подтверждены в другом исследовании с использованием химерного штамма *rA2-line19F* РСВ, который представлял собой штамм *A2*, но с белком F от штамма *line 19*. Данный химерный штамм вируса в отличие от *A2* оказался способен активировать продукцию IL-13 и, как следствие, вызывать гиперсекрецию слизи и ГРБ (таблица) [42]. Таким образом, поверхностный гликопротеин F способен определять патогенность штамма вируса. Дополнительное подтверждение этому было получено в исследовании Stokes et al. [34], которые изучили способность индуцировать патологию респираторного тракта инфекцией не только лабораторными штаммами РСВ (*A2*, *line 19* и *long*), но и клиническими изолятами. Некоторые изоляты практически не вызывали патологических изменений у мышей, однако 2 из 6 изученных изолятов индуцировали выраженную патологию, которая включала инфильтрацию лёгких провоспалительными клетками, а также IL-13-опосредованную ГРБ и продукцию слизи (таблица) [34]. Эти данные объясняют различную тяжесть патологии, наблюдаемую в клинической практике в различные эпидемиологические сезоны. Учитывая тот факт, что IL-13 и IFN γ продуцируются в основном Т-клетками и являются антагонистами, авторы предположили, что РСВ индуцирует экспрессию IL-13 не в Th2-клетках, а в альтернативно активированных макрофагах, т.к. нокаут *IL-13* не приводил к увеличению IFN γ в лёгких инфицированных мышей [34].

Позднее была показана способность штамма РСВ *A2* вызывать ГРБ и гиперсекрецию слизи бронхиальным эпителием, но в высокой дозе (5×10^6 ТЦД₅₀/мышь); при этом экспрессия IL-13 в ходе инфекции не повышалась, а вышеуказанные признаки патологии, скорее всего, развивались по TNF α -зависимому механизму (таблица) [43]. Эти данные указывают на существование различных молекулярных механизмов развития одних и тех же патологических изменений.

Роль Т-клеток. С использованием моделей на мышах была показана роль Т-клеток в антивирусной защите от РСВ. Мыши, у которых отсутствовали Т-клетки после удаления тимуса (*nu/nu* B6BLV/c) или экспозиции в гамма-излучении, были более восприимчивы к РСВ-инфекции и развивали более тяжёлую патологию в сравнении с мышами, у которых присутствовали функциональные Т-клетки [44]. Адоптивный перенос таким мышам Т-клеток, праймированных вирусом, способствовал ускоренному клиренсу респираторного тракта от РСВ. При этом праймированные Т-клетки проявляли антивирусный эффект благодаря цитотоксичес-

ким свойствам и независимо от гуморальной иммунной системы, т.к. клиренс лёгких от вируса происходит в отсутствие вирус-специфических антител [44]. Однако присутствие вирус-специфических антител ускоряло клиренс лёгких от РСВ, что свидетельствует о важной роли не только клеточного, но и гуморального звена иммунитета в антивирусной защите [44]. Аналогичные наблюдения сделаны в клинической практике. На модели РСВ-инфекции у человека продемонстрировано, что увеличение количества CD8 Т-клеток в образцах БАЛ коррелировало со снижением вирусной нагрузки [45].

Впоследствии роль Т-клеток в патогенезе РСВ-инфекции была многократно подтверждена, чему посвящён ряд обзоров [46–48]. Согласно современным данным, при первичной инфекции дендритные клетки (ДК) поглощают и презентуют антигены вируса и активируют вирус-специфические CD8 Т-клетки в региональных лимфоузлах, которые мигрируют в респираторный тракт и осуществляют протективный эффект. Количество активированных Т-клеток в бронхиальных аспиратах пациентов с РСВ-инфекцией достигает максимума через 10 суток после развития симптомов заболевания, при этом вирус-специфические CD8 Т-клетки локализуются преимущественно в паренхиме лёгких, а не циркулируют в кровеносной системе. В ходе инфекции активированные Т-клетки продуцируют провоспалительные цитокины IFN γ и TNF α . После разрешения инфекции CD8 Т-клетки остаются в организме в виде клеток памяти в течение нескольких месяцев и обеспечивают защиту от последующих инфекций. При вторичной инфекции Т-клетки значительно быстрее аккумулируются в лёгких, преимущественно за счёт миграции, а не пролиферации (рис. 1, а), и осуществляют цитотоксический эффект в отношении инфицированных клеток за счёт способности индуцировать апоптоз инфицированной клетки или осуществлять прямой её лизис путём продукции гранзимов и перфоринов (рис. 1, б). Также продукция провоспалительных цитокинов IFN γ и TNF α инициирует смерть инфицированных клеток [46, 47].

Углублённые исследования позволили установить несколько субтипов Т-клеток, памяти: T_{CM} – центральные Т-клетки памяти, локализующиеся во вторичных лимфоидных органах; T_{EM} – эффекторные Т-клетки памяти, которые мигрируют в респираторный тракт и осуществляют эффекторные функции. Эти два субтипа клеток (T_{CM} и T_{EM}) присутствуют одновременно в системном кровотоке и в респираторном тракте. Ещё один субтип Т-клеток, которые локализуются только в лёгких – T_{RM} (тканерезидент-

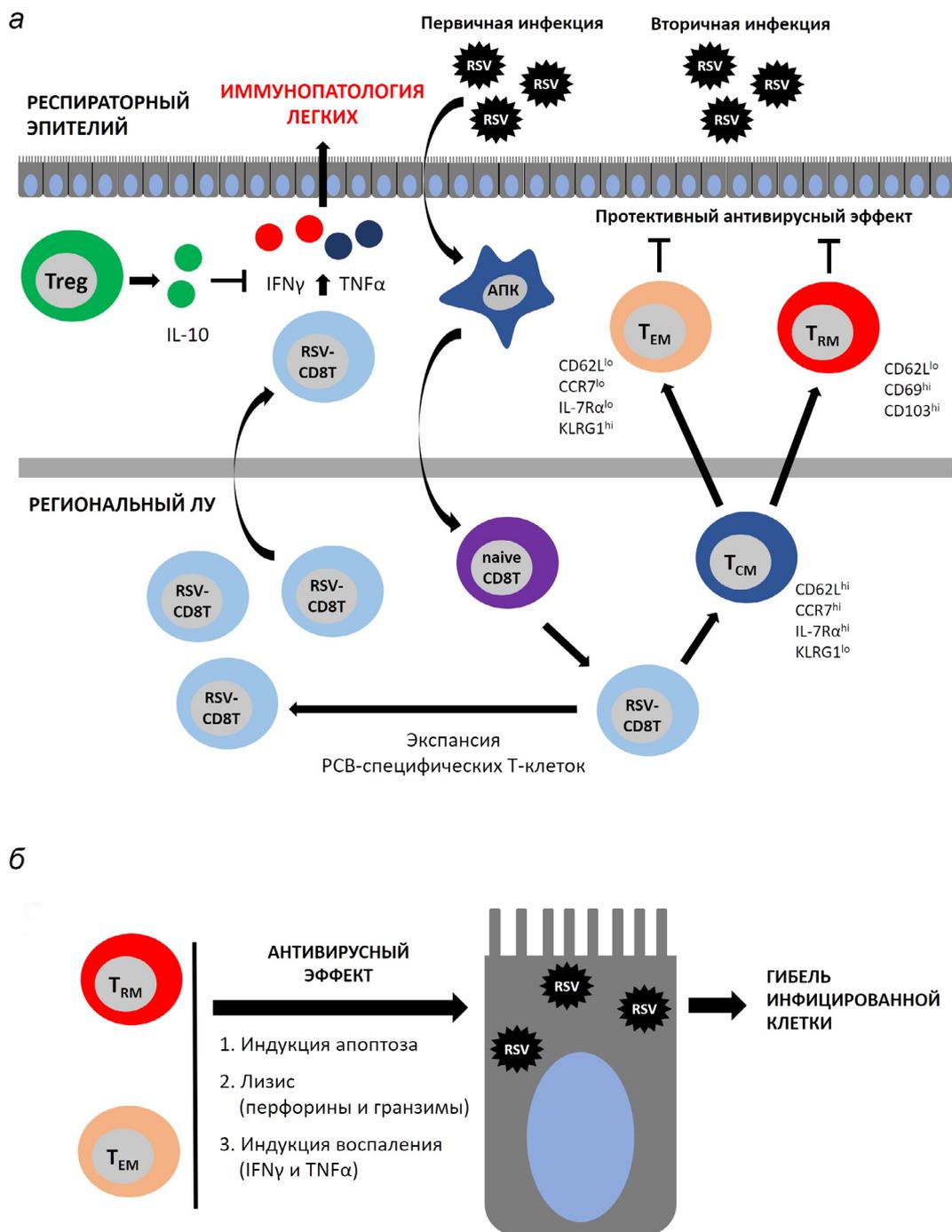


Рис. 1. Роль Т-клеток в антивирусной защите и иммунопатологии лёгких. *а* – CD8 Т-клеточный ответ развивается после первичной РСВ-инфекции. Антигены вируса презентуются антиген-презентирующими клетками (АПК), в роли которых зачастую выступают дендритные клетки. Наивные CD8 Т-клетки (naïve CD8 T) активируются и дифференцируются в РСВ-специфические CD8 Т-клетки (RSV-CD8 T), которые пролиферируют, достигая пика через 8–10 дней после инфекции. RSV-CD8 Т-клетки продуцируют значительные количества провоспалительных цитокинов IFN γ и TNF α , которые в значительной степени опосредуют развитие иммунопатологии лёгких. После пика экспансии количество RSV-CD8 Т-клеток уменьшается, и из них формируется популяция Т-клеток памяти. Выделяют несколько фенотипов Т-клеток памяти. 1. T_{CM} – центральные Т-клетки памяти (CD62L^{hi}/CCR7^{hi}/IL-7R α ^{hi}/KLRG1^{lo}) циркулируют в кровеносном русле и аккумулируются во вторичных лимфоидных органах. 2. T_{EM} – эффекторные Т-клетки памяти (CD62L^{lo}/CCR7^{lo}/IL-7R α ^{lo}/KLRG1^{hi}) преимущественно локализируются в лёгких, но способны к циркуляции в кровотоке. 3. T_{RM} – тканерезидентные Т-клетки памяти (CD62L^{lo}/CD69^{hi}/CD103^{hi}) локализируются исключительно в лёгких и не способны к циркуляции в кровотоке. *б* – T_{EM} и T_{RM} осуществляют протективный антивирусный эффект, запуская апоптоз или прямой лизис инфицированной клетки. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ные CD8 T-клетки памяти). Именно они представляют собой «первую линию» защиты от повторных инфекций [45–47, 49] (рис. 1, а).

Роль T-клеток в РСВ-индуцированной иммунопатологии лёгких. Несмотря на антивирусный эффект, T-клетки вовлечены в развитие иммунопатологии лёгких [50]. Экспериментально показано, что депляция CD8 T-клеток приводит к увеличению репродукции вируса в лёгких, но при этом патологические изменения респираторного тракта уменьшаются [51]. Наоборот, увеличение количества CD8 T-клеток утяжеляет патологические процессы в лёгких, но при этом вирусная нагрузка снижается [52]. Согласно последним данным, в индукцию такой иммунопатологии вовлечены цитокины TNF α и IFN γ , продуцируемые вирус-специфическими T-клетками. Нейтрализация TNF α с помощью мАт перед инфекцией приводила к ослаблению патологических изменений в лёгких [52]. Аналогично нейтрализация IFN γ или нокаут соответствующего гена снижает выраженность иммунопатологии лёгких после заражения РСВ (таблица, рис. 1, а) [52, 53].

Примечательно, что такая иммунопатология, опосредованная T-клетками, характерна для РСВ-инфекции, но не для всех респираторных вирусов. Например, CD8 T-клетки памяти обладают протективным эффектом по отношению к вирусу гриппа и коронавирусу (штамм MA15), при этом не вызывают иммунопатологии лёгких [54, 55].

Данные об участии T-клеток в иммунопатологии, полученные на моделях у мышей, коррелируют с клиническими наблюдениями. Отмечалось, что увеличение числа CD8 T-клеток в образцах БАЛ приводило к более выраженной патологии респираторного тракта пациентов с РСВ-инфекцией [56]. Также после трансплантации костного мозга у пациента возрастало количество CD8 T-клеток и коррелировало со снижением титра РСВ в назальных смывах, однако появление CD8 T-клеток негативно сказывалось на функции дыхания пациентов, что являлось маркёром патологических изменений в лёгких [57].

В нивелировании патологии опосредованной CD8 T-клетками играют роль T-регуляторные клетки (Treg). Они оказывают благоприятный эффект на тяжесть патологии лёгких. Депляция Treg на фоне РСВ-инфекции приводила к увеличению количества CD8 T-клеток, повышению продукции TNF α и IFN γ и, как следствие, к усилению патологии лёгких [58]. Увеличение количества Treg перед инфекцией приводило к обратному эффекту [59]. Treg оказывают такой эффект за счёт продукции значительного количества противовоспалительного IL-10. Его

нейтрализация с помощью мАт или нокаут соответствующего гена усиливали патологию лёгких (таблица, рис. 1, а) [60, 61].

Кроме того, согласно последним данным, клетки T_{RM} способны осуществлять антивирусную защиту, не вызывая иммунопатологии лёгких. В исследовании Kinnear et al. [62] наивным мышам перед РСВ-инфекцией интраназально вводили T_{RM}-клетки, полученные из лёгких инфицированных мышей. В итоге эти клетки существенно снижали вирусную нагрузку в лёгкие и уменьшали тяжесть патологии; при этом CD8 T_{RM}-клетки обеспечивали антивирусные свойства, в то время как CD4 T_{RM}-клетки не влияли на репродукцию РСВ, но оказывали противовоспалительный эффект, подавляя экспрессию TNF α (таблица) [62]. Стоит отметить, что формирование T_{RM}-клеток в лёгких происходит после локальной (а не системной) иммунизации антигенами вируса [49]. По всей видимости, именно локальный (например, аэрозольный) способ вакцинации будет являться перспективным для профилактики РСВ.

Стоит отметить, что провоспалительный цитокин – TNF α – продуцируется не только CD8 T-клетками под действием вируса, но и макрофагами. Макрофаги, выделенные от мышей, нокаутных по гену, кодирующему TLR2, продуцировали значительно меньше TNF α после стимуляции вирусом по сравнению с макрофагами мышей дикого типа [63]. Клетки респираторного эпителия также продуцируют TNF α после их стимуляции вирусом, что показано в исследованиях *in vitro* с применением мАт, блокирующих TNF α [64]. Таким образом, помимо CD8 T-клеток в РСВ-индуцированной иммунопатологии лёгких задействованы и другие типы клеток (макрофаги и эпителиальные клетки).

Роль гуморального иммунитета. Ввиду значительных отличий в строении и функции антител человека и мышей модели на этих животных практически не использовались для изучения роли адаптивной иммунной системы в патогенезе РСВ-инфекции. Значительная часть данных была получена на моделях РСВ-инфекции у человека, когда добровольцев инфицировали очищенным вирусом. На таких моделях было установлено, что антитела класса IgA, выделенные из назальных смывов, а также сывороточные антитела класса IgG оказывали протективный эффект в отношении вируса [65]. При этом IgA проявляли более выраженный и длительный по времени анти-РСВ-эффект в сравнении с IgG-антителами [66].

Нейтрализующие антитела вырабатываются в основном на белок F вируса. Иммунологическое картирование этого белка выявило семь

главных антигенных сайтов: \emptyset , I, II, III, IV, V и VIII. При этом сайты \emptyset , V и VIII существуют только на префузионной конформации белка F [67, 68]. Было показано, что большинство вируснейтрализующих антител (более 60%), выделенных из В-клеток пациентов, перенёсших РСВ-инфекцию, направлены против сайтов \emptyset , V [69] и VIII [68]. В то же время антитела, направленные к сайтам II, III и IV, обладают значительно (в 100–1000 раз) меньшими вируснейтрализующими свойствами.

Это связано с тем, что антигенные сайты \emptyset , V и VIII представлены на префузионной, а не на постфузионной форме белка F. Связывание антител с этими сайтами стабилизируют белок F, препятствуя его перестройке в постфузионную конформацию и, как следствие, процессу слияния вириона и клетки [67, 68].

В составе препарата паливизумаб содержатся антитела против антигенного сайта II, который располагается на постфузионной форме белка F. Проведённые исследования показали, что мАт против сайтов \emptyset , V и VIII обладали значительно более высоким (в 100–1000 раз) вируснейтрализующим эффектом в сравнении с препаратом паливизумаб (таблица) [68, 70]. Полученные новые данные об антигенной структуре белка F позволят создать не только более эффективные аналоги паливизумаба, но и разработать эффективную вакцину.

На другой поверхностный гликопротеин вируса – белок G – также формируются нейтрализующие антитела, особенно к его центральному консервативному домену [71], однако существование растворимой формы этого белка может нивелировать их антивирусный эффект (таблица) [72].

В ответ на РСВ-инфекцию образуются также антитела класса IgE. Однако они не обладают антивирусным эффектом, а наоборот, играют неблагоприятную роль в патогенезе инфекции. В частности, РСВ-специфические IgE-антитела инициируют высвобождение тучными клетками гистамина и лейкотриенов, индуцируя воспалительные реакции [73].

Роль интерферонов. У человека идентифицировано три типа интерферонов: IFN-I, IFN-II и IFN-III, каждый из которых проявляет биологическую активность посредством своего рецептора. IFN-I и IFN-III напрямую участвуют в антивирусной защите организма [74, 75]. Индукция интерферонов происходит после взаимодействия гликопротеинов РСВ с TLR-рецепторами (TLR2, TLR6, TLR3, TLR4, и TLR7) на поверхности лейкоцитов, плазматоцитозидных ДК и альвеолярных макрофагов [76]. Белок F распознается TLR4, что приводит к продукции IFN-I [77]. Нокаут соот-

ветствующего гена снижает способность мышей осуществлять клиренс вируса [76]. Рецепторы TLR2 и TLR6 также вовлечены в распознавание лигандов РСВ. Нокаут соответствующих генов приводит к увеличению вирусной нагрузки (таблица, рис. 2) [63]. Эндосомальный NLR-рецептор Nod2 распознают вирусную РНК и инициируют продукцию IFN-I [78–80].

Роль интерферонов в патогенезе РСВ-инфекции показана в экспериментах на моделях у мышей. Инактивация гена, кодирующего фактор STAT1 (транскрипционный фактор, участвующий в IFN-I/II-опосредованной сигнальной трансдукции), приводит к увеличению вирусной нагрузки в лёгкие, усилению ГРБ, гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием, увеличенной инфильтрации лёгких провоспалительными клетками [81] (таблица, рис. 2). С использованием биоматериала от пациентов установлено, что IFN-I и IFN-III активируются в первые два дня после инфекции [82]. Стоит отметить, что третий тип интерферонов (IFN-III) включает в себя 4 представителя: IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 (известные как IL-29, IL-28A и IL-28B), а также IFN- λ 4. В исследовании Selvaggi et al. [82] показано, что у детей, госпитализированных с диагностированной РСВ-инфекцией, значительно повышена экспрессия генов *IFN- λ 1–IFN- λ 3* в назальных смывах; при этом выявлена прямая корреляция между уровнем экспрессии IFN- λ 1, тяжестью патологии и ухудшением функции лёгких. В то же время эффект РСВ-инфекции на экспрессию IFN- λ 4 бронхиальным эпителием ещё не изучался.

По сравнению с другими респираторными вирусами РСВ индуцирует слабый интерфероновый ответ, особенно у детей [83]. Данные, полученные на модели РСВ-инфекции неонатальных мышей подтверждают этот факт; инфекция вирусом мышей в возрасте 5 дней не индуцирует экспрессию IFN α и IFN β в лёгких по сравнению с половозрелыми мышами (6–8 недель). При этом введение экзогенного IFN α нивелировало проявления патологии (таблица) [84]. В отдельном исследовании показано, что интраназальное введение IFN α неонатальным мышам перед инфекцией приводит к значительному снижению вирусной нагрузки в лёгких путём повышения продукции протективных антител класса IgA в слизистой оболочке дыхательных путей (таблица) [85].

Одно из объяснений aberrантного IFN-ответа в раннем возрасте – это низкое количество плазматоцитозидных ДК и макрофагов, главных продуцентов IFN-I в респираторном тракте [84, 86]. Эти данные, полученные на модели у мы-

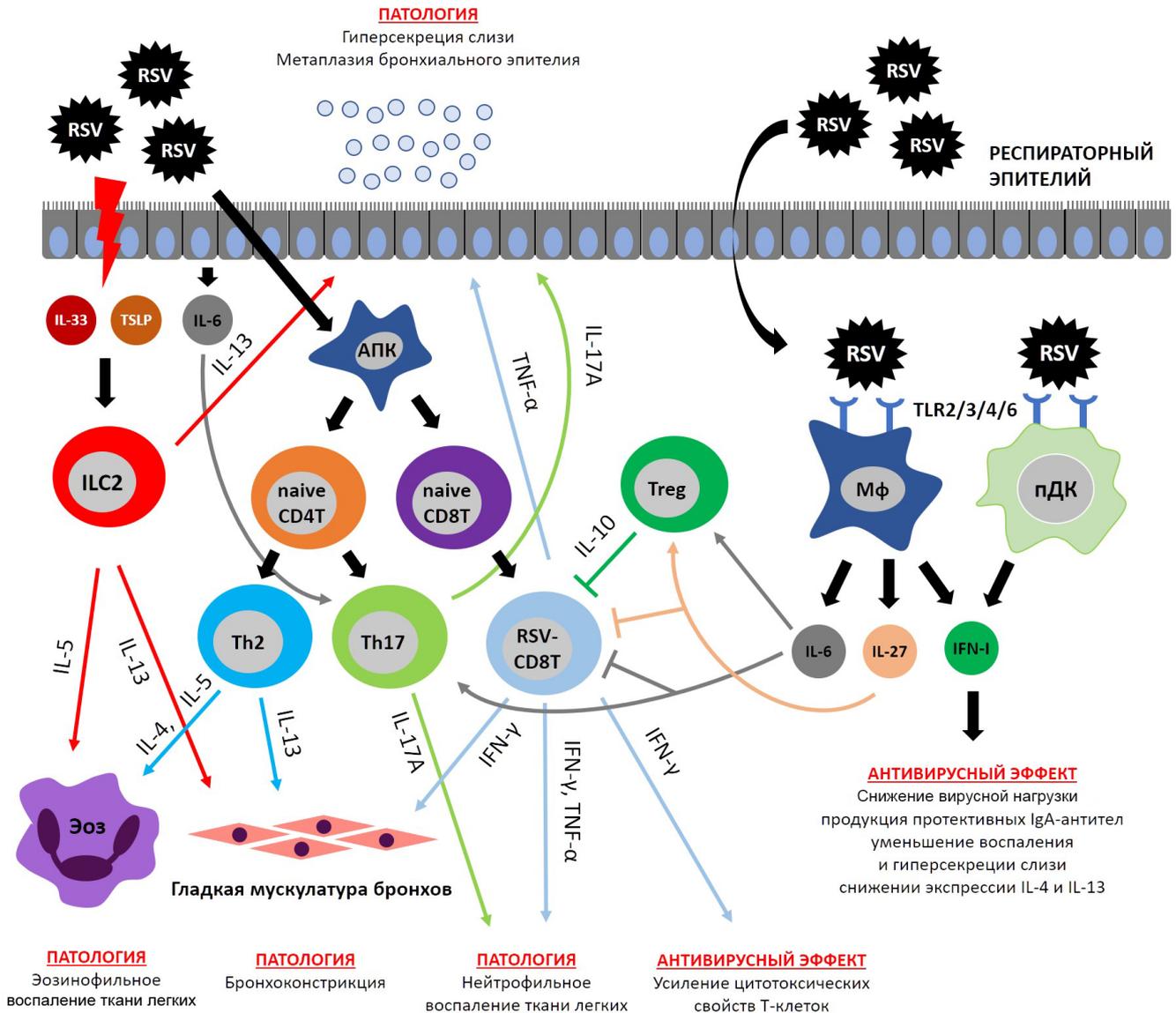


Рис. 2. Иммунопатогенез РСВ-инфекции. РСВ-инфекция активирует пролиферацию CD8 Т-клеток, продуцирующих цитокины $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, которые вовлечены в формирование основных проявлений патологии. Дополнительно $IFN\gamma$ вовлечён не только в развитие патологии, но и в антивирусную защиту организма. РСВ вызывает некроз респираторного эпителия, приводя к высвобождению цитокинов IL-33 и TSLP, которые активируют врождённые лимфоидные клетки типа 2 (ILC2), продуцирующие цитокины IL-5 и IL-13. Данные цитокины участвуют в формировании проявлений патологии, вызывают эозинофильное воспаление лёгких, а также гиперпродукцию слизи и гиперреактивность бронхов. Кроме того, при РСВ-инфекции под действием определенного цитокинового микроокружения происходит поляризация Th2- и Th17-иммунного ответа. Th2-клетки продуцируют цитокины IL-4, IL-5 и IL-13, которые приводят к развитию гиперреактивности бронхов, гиперсекреции слизи и эозинофильному воспалению лёгких. Th17-клетки продуцируют IL-17A, который формирует нейтрофильное воспаление лёгких и гиперсекрецию слизи. Иммунорегуляторные функции выполняет цитокин IL-10, продуцируемый Т-регуляторными клетками (Treg). IL-10 подавляет провоспалительную активность CD8 Т-клеток. Сходными свойствами обладают IL-6 и IL-27. Они способны как напрямую супрессировать CD8 Т-клетки, так и активировать Treg. РСВ распознается TLR-рецепторами на поверхности макрофагов (Mφ) и плазмациитоидными ДК (пДК), которые продуцируют ограниченное количество интерферонов типа I ($IFN-I$), обладающих антивирусным эффектом

шей, совпадают с результатами широкомасштабного клинического исследования INFANT, которое показало, что РСВ-инфекция у детей не индуцирует сколько-нибудь значительного

IFN -ответа в слизистой оболочке дыхательных путей [87]. Вышеупомянутые исследования показывают сходство иммунного ответа на РСВ у мышей и человека, что позволяет изучать роль

компонентов врождённого иммунитета на этом модельном виде животных.

Несмотря на значительное количество накопленных сведений об антивирусной активности IFN-I и IFN-III, их эффективность для анти-PCB-терапии противоречива. Это связано со способностью PCB «уходить» от интерфероновому ответу [48]. В частности, два неструктурных белка вируса (NS1 и NS2) связываются с фактором RIG-I в цитоплазме инфицированной клетки и супрессируют соответствующие пути сигнальной трансдукции. Также существуют сведения об участии белка G в ослаблении интерфероновому антивирусному эффекту за счёт активации белков-супрессоров интерферонов – SOCS1 и SOCS3. Белки SOCS1 и SOCS3 активируются по TLR-зависимому пути в ответ на PCB-инфекцию, после чего они ингибируют продукцию интерферонов в клетке [88]. Таким образом, PCB обладает механизмами, позволяющими не только блокировать сигнальный антивирусный ответ интерфероновых рецепторов, но и супрессировать продукцию эндогенных интерферонов, что ограничивает их медицинское применения для терапии PCB. Кроме того, в отдельных случаях интерфероны способствуют более тяжёлому течению PCB-инфекции [82].

Роль цитокинов. PCB приводит к повышенной продукции ряда провоспалительных цитокинов: IFN γ , TNF α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A и других как при естественной инфекции у человека [89], так и в моделях у мышей [39]. Большинство провоспалительных цитокинов продуцируется вирус-специфическими CD8 T-клетками, а также макрофагами, эпителиальными клетками и ILC2 [39, 45, 52].

У пациентов с PCB-инфекцией фиксируется увеличение продукции IFN γ как в назальных смывах, так и в сыворотке крови [89]. Кроме того, тяжёлое течение инфекции ассоциировано с пониженным уровнем IFN γ [90]. Аналогичные данные получены на моделях у мышей. Введение IFN γ в дыхательные пути усиливает клиренс вируса в лёгких [91], в то время как нокаут соответствующего гена, наоборот, приводил к усилению репликации PCB (таблица, рис. 2) [92]. Все эти данные свидетельствуют о протективном антивирусном эффекте данного цитокина. Стоит отметить, что IFN γ может играть неблагоприятную патогенетическую роль, т.к. его введение на фоне PCB-инфекции усиливало у модельных мышей воспаление в лёгких и вызывало обструкцию бронхов (таблица, рис. 2) [91], в то время как его нейтрализация с помощью мАт приводила к уменьшению иммунопатологии лёгких [52]. Таким образом, IFN γ играет протективную роль в отношении PCB-инфекции, од-

нако его роль в развитии иммунопатологии лёгких остаётся противоречивой.

Другой цитокин – TNF α – также вносит вклад в иммунопатологию лёгких при PCB-инфекции. Его нейтрализация с помощью мАт не влияет на репликацию PCB, но приводит к ослаблению воспаления в лёгких (рис. 2) [52].

В ходе PCB-инфекции активируется продукция не только провоспалительных, но и регуляторных цитокинов, например IL-10. Повышение экспрессии IL-10 наблюдается как на моделях у мышей [61], так и в клинической практике у человека [89]. IL-10 продуцируется в основном T-регуляторными клетками (Treg) [61] и обладает противовоспалительным эффектом, что частично компенсирует вирус-индуцированное воспаление респираторного тракта. Мыши, нокаутные по данному гену, подвержены более тяжёлому воспалению лёгких на фоне PCB-инфекции. Такой эффект IL-10 связан с тем, что он подавляет способность CD8 T-клеток продуцировать провоспалительные цитокины IFN γ и TNF α (таблица, рис. 2) [61]. Аналогичные наблюдения были сделаны и в клинической практике, когда снижение экспрессии IL-10 и генов IL-10-сигнального пути коррелировало с тяжестью патологии [93].

В моделях на мышах показано, что продукция IL-4 ассоциирована с тяжестью течения PCB-инфекции [94]. Аналогичные наблюдения были сделаны и при исследовании назальных смывов пациентов с PCB-инфекцией [95]. Наоборот, нейтрализация IL-4 с помощью мАт приводила к нивелированию воспаления при инфекции (рис. 2) [94]. Это связано с тем, что данный цитокин ослабляет антивирусную цитолитическую активность CD8 T-клеток [96]. Другой Th2-цитокин – IL-13 – задействован в развитии гиперпродукции слизи и ГРБ при PCB-инфекции, т.к. нокаут соответствующего гена нивелирует вышеуказанные проявления патологии (таблица, рис. 2) [41]. По всей видимости, продукция IL-13, осуществляемая ILC2, регулируется цитокином TSLP, т.к. его нейтрализация снижает уровень экспрессии IL-13 и гиперсекрецию слизи (таблица, рис. 2) [97].

Цитокин IL-17A, который продуцируется в основном Th17-клетками, индуцирует нейтрофильное воспаление лёгких и гиперпродукцию слизи при PCB-инфекции у мышей (таблица, рис. 2) [98]. Продукция эпителиальными клетками и макрофагами другого провоспалительного цитокина – IL-6 – также увеличивается при PCB-инфекции. Данный цитокин необходим для поляризации Th17-клеток. Несмотря на провоспалительные свойства IL-6, его нейтрализация с помощью мАт перед заражением ла-

бораторных животных приводила к утяжелению патологического процесса. Вероятно, это связано с тем, что нейтрализация IL-6 приводит к увеличению числа вирус-специфических CD8⁺ Т-клеток в лёгких и, как следствие, к усилению продукции провоспалительных цитокинов TNF α и IFN γ и снижению концентрации регуляторных цитокинов IL-10 и IL-27. При этом концентрация IL-17A значительно снижалась (таблица, рис. 2) [99]. По этой причине не проводились клинические исследования эффективности анти-IL-6 и анти-IL-17-терапии у пациентов с РСВ-инфекцией. Сходным образом IL-27 активируется при РСВ-инфекции. Однако его инактивация с помощью мАт приводит к усилению патологических процессов в лёгких мышей за счёт увеличения числа CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ и TNF α . Таким образом, в иммунопатогенезе РСВ-инфекции IL-6 и IL-27 играют сходную роль: снижают активность CD8⁺ Т-клеток и активируют Трег-клетки (таблица, рис. 2) [99].

Несмотря на отсутствие исследований клинической эффективности анти-IL-6-терапии у пациентов с РСВ-инфекцией, недавно был опубликован ряд работ, в которых описаны попытки применения в клинической практике моноклональных антител против IL-6 (препараты Tocilizumab, Sarilumab и Siltuximab) для лечения пациентов с диагнозом COVID-19. Систематизация результатов 10-ти клинических исследований не выявила существенных благоприятных эффектов от данной терапии [100, 101]. Обсуждается также возможность применения анти-IL-17 мАт для лечения пациентов с COVID-19 [102], однако опубликованные результаты таких исследований отсутствуют. Анти-IL-17 мАт применялись для лечения нейтрофильного воспаления лёгких при средней и тяжёлой бронхиальной астме. Применение препарата Brodalumab (мАт против IL-17RA – цепи рецептора для IL-17A, IL-17F и IL-25) не показало клинической эффективности. Исследования другого анти-IL-17-препарата (СJM112 – мАт против IL-17A) продолжаются [103].

Недавно была показана роль цитокинов, продуцируемых эпителием (IL-33 и TSLP) в патогенезе РСВ-инфекции. Было выявлено, что у неонатальных мышей повышена экспрессия провоспалительного цитокина IL-33 в ткани лёгких [104]. Данный цитокин активирует врождённые лимфоидные клетки типа II (ILC2), которые продуцируют значительные количества IL-13, что в итоге способствует формированию Th2-иммунного ответа на РСВ-инфекцию. Нейтрализация IL-33 или нокаут гена его рецептора приводили к уменьшению патологии лёг-

ких, но не влияли на репликацию вируса (таблица, рис. 2) [104]. Сходные результаты были получены в наших исследованиях: супрессия IL-33 молекулами миРНК приводила к уменьшению воспаления в лёгких, но не вирусной нагрузки [105]. Другой цитокин, продуцируемый бронхиальным эпителием – TSLP – также участвует в РСВ-индуцированном воспалении лёгких. Его инактивация уменьшает количество ILC2 в респираторном тракте [97].

Роль активных форм кислорода. Накоплены убедительные доказательства, что активные формы кислорода (АФК) являются важным фактором воспаления лёгких и повреждения тканей (в основном бронхиального эпителия) при РСВ-инфекции. В 2004 г. было показано, что РСВ индуцирует образование АФК, которые, в свою очередь, запускают воспалительный каскад за счёт активации факторов STAT в эпителиальных клетках [106]. Известно, что ген, кодирующий фактор IRG1, вовлечён в регуляцию АФК. РСВ-инфекция эпителиальных клеток *in vitro* приводит к активации IRG1 и продукции АФК. Эти данные подтверждаются экспериментами *in vivo* при инфекции мышей вирусом. Нокаут этого гена молекулами миРНК уменьшает продукцию АФК и, как следствие, воспаление в лёгких (таблица) [107].

НЕДОСТАТКИ МОДЕЛЕЙ РСВ-ИНФЕКЦИИ НА МЫШАХ

Несмотря на очевидные сходства в протекании РСВ-инфекции у человека и модельных животных, мышей, существуют и значительные отличия. Главный критицизм моделей на мышах состоит в том, что РСВ не является естественным для них патогеном, вследствие чего плохо реплицируется в их респираторном тракте, поэтому для индукции патологических изменений мышей заражают высокими дозами вируса. Кроме того, РСВ-инфекция у человека часто сопряжена с выраженным нейтрофильным воспалением дыхательных путей; доля этих клеток в образцах БАЛ достигает 80%, при этом у мышей нейтрофилы не являются доминантными воспалительными клетками, достигая лишь 20%. Естественная РСВ-инфекция индуцирует как Th1-, так и Th2-иммунный ответ и сопровождается инфильтрацией респираторного тракта пациентов эозинофилами, в то время как у мышей индуцируется лишь Th1-тип иммунного ответа, а эозинофилы в лёгких практически отсутствуют [48].

Несмотря на вышеуказанные ограничения, моделирование РСВ-инфекции на мышах поз-

Роль моделей в изучении патогенеза РСВ-инфекции

Ссылка	Линия мышей; штамм РСВ	Доза РСВ, pfu	Тип клеток
Патологические изменения в дыхательных путях при РСВ-инфекции			
[35]	20 линий мышей; РСВ <i>long</i>	10^3 – 10^4 pfu	впервые показана способность РСВ к репродукции в дыхательных путях мышей: наиболее резистентны к репликации вируса мыши линии СВА/СаНН, а наиболее чувствительны – мыши линии DBA/2N
[36, 37]	BALB/c; РСВ <i>A2</i>	10^4 – 10^6 pfu	описаны патологические изменения в дыхательных путях, вызванные репликацией РСВ: пик репродукции вируса выявлен в период 3–4 суток после инфекции (для верхних дыхательных путей) и 4–6 суток (для нижних дыхательных путей); репликация вируса происходит в эпителии альвеол, но не в бронхиальном эпителии; потеря активности и массы тела (до 20%) является интегральным показателем патологии; происходила инфильтрация легких лимфоцитами и макрофагами, утолщение стенки бронхиол и слузивание респираторного эпителия; формирование гигантских мультиядерных клеток в эпителии бронхов; антитела к РСВ вырабатывались через 2 недели после инфекции
[39]	BALB/c; РСВ <i>A2</i>	10^6 – 10^7 pfu	показано, что РСВ-инфекция вызывает гиперреактивность «дыхательных» путей: вирус достигал пика репликации в дыхательных путях на 3–5 сутки после инфекции; на 7-е сутки он практически не детектировался; гиперреактивность бронхов и гиперпродукция слизи достигали пика на 5-е сутки после инфекции и сохранялись в течение 42 дней; развитие ГРБ статистически значимо коррелировало с гиперпродукцией слизи и степенью инфильтрации лёгких провоспалительными клетками, но не с вирусной нагрузкой; патологические изменения ткани лёгких достигали максимума на 4–5 сутки после инфекции и сохранялись в течение 154-х дней; РСВ-инфекция активировала экспрессию провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-6, IFN γ , IL-4, IL-10, KC, MIG, RANTES, MIP-1a, и eotaxin
[40]	BALB/c; РСВ <i>long</i>	10^7 pfu	РСВ вызывал воспаление лёгких и ГРБ, которые были выражены в период 2–10 суток после инфекции; РСВ индуцировал продукцию лейкотриенов, которые опосредуют гиперсекрецию слизи и ГРБ
[42]	BALB/cJ; РСВ штамм <i>rA2-line19F</i>	10^5 pfu	был создан химерный штамм РСВ <i>A2</i> с F-белком из штамма <i>line 19</i> ; химерный штамм более интенсивно реплицировался в дыхательных путях по сравнению со штаммами <i>long</i> и <i>A2</i> , вызывал IL-13-зависимую гиперсекрецию слизи и ГРБ, а также в меньшей степени индуцировал IFN α
[34]	BALB/cJ; Лабораторные штаммы: РСВ <i>A2</i> , РСВ <i>line 19</i> , РСВ <i>long</i> ; Клинические изоляты РСВ: A2001/2-20, A2001/3-12, A1997/12-35, A1998/3-2, A1998/12-21, A2000/3-4	10^5 pfu	разные штаммы РСВ вызывают различную степень выраженности патологии: штамм <i>A2</i> преимущественно локализовался в альвеолярных регионах лёгких, в то время как клинические изоляты – в бронхиальном эпителии; клинические изоляты A2001/2-20 и A2001/3-12 вызывали IL-13-опосредованную ГРБ и гиперпродукцию слизи, а также более тяжёлую патологию лёгких в сравнении с лабораторными штаммами; нокаут <i>IL-13</i> приводил к существенному снижению гиперсекреции слизи эпителием бронхов мышей, инфицированных изолятами; вероятно, РСВ индуцирует экспрессию IL-13 не в Th2-клетках, а в альтернативно активированных макрофагах, т.к. нокаут <i>IL-13</i> не приводил к увеличению IFN γ в легких инфицированных мышей
[38]	BALB/c; <i>rHRSV-Cherry rHRSV-Luc</i>	5×10^4 pfu	реализована прижизненная визуализация репродукции вируса в дыхательных путях мышей: пик репродукции РСВ в верхних дыхательных путях достигался через 3 дня после инфекции, а в нижних – на 4–5 день, при этом оба лёгких были поражены вирусом в равной степени; в данной дозе РСВ не вызывал значительных патологических проявлений
[43]	BALB/c; РСВ <i>A2</i>	5×10^6 ТЦД $_{50}$	показано РСВ-индуцированное развитие ГРБ по IL-13-независимому пути: РСВ-инфекция вызывала падение массы тела, ГРБ, инфильтрацию лёгких макрофагами и лимфоцитами, но не эозинофилами и нейтрофилами, и гиперплазию слизепroduцирующих бокаловидных клеток; РСВ вызывал повышение экспрессии IFN γ и TNF α , но не IL-13, что свидетельствует о возможности развития ГРБ по IL-13-независимому механизму

Продолжение таблицы

Ссылка	Линия мышей; штамм РСВ	Доза РСВ, pfu	Тип клеток
Роль Т-клеток в антивирусной защите и иммунопатологии лёгких			
[44]	nu/nu BALB/c; PCV A2	5×10^4 pfu	впервые показана роль Т-клеток в клиренсе лёгких от РСВ
[50]	BALB/c; PCV A2	2×10^5 pfu	впервые показана роль Т-клеток в развитии иммунопатологии лёгких после РСВ-инфекции: введение Т-клеток инфицированным мышам приводило к снижению вирусной нагрузки, но усиливались патологические процессы в лёгких
[51]	BALB/c; PCV A2	10^7 pfu	деплегия CD4 и CD8 Т-клеток приводила к увеличенной репродукции вируса, при этом признаки патологии ослаблялись
[62]	BALB/c; PCV A2	10^5 pfu	впервые показана роль резидентных CD8 Т-клеток памяти (T_{RM}) в антивирусной защите лёгких: локальная (интраназальная) иммунизация мышей антигеном вируса приводила к увеличению количества T_{RM} в лёгких, которые не вызывали значительной иммунопатологии лёгких в сравнении другими субтипами Т-клеток памяти; интраназальное введение CD8 T_{RM} оказывало значительный антивирусный эффект, а введение CD4 T_{RM} подавляло экспрессию провоспалительного TNF α и выраженность патологии, но не влияло на репликацию патогена
[52]	BALB/c; PCV A2	10^6 pfu	показано, что IFN γ и TNF α , продуцируемые CD8 Т-клетками памяти не влияют на репродукцию вируса, но вызывают иммунопатологию лёгких: CD8 Т-клетки памяти при отсутствии CD4 Т-клеток и антител осуществляли протективный антивирусный эффект, но индуцировали иммунопатологию лёгких при РСВ-инфекции; иммунопатология лёгких развивалась за счёт продукции IFN γ и TNF α CD8 Т-клетками, т.к. их нейтрализация с помощью мАт нивелировала иммунопатологию лёгких, при этом не влияла на вирусную нагрузку; T_{RM} -клетки проявляли антивирусный эффект без индукции иммунопатологии лёгких
Роль гуморального иммунитета			
[72]	BALB/c; PCV A2	10^6 pfu	показана способность анти-G мАт снижать вирусную нагрузку и выраженность воспаления в лёгких
[70]	BALB/c; PCV A2	10^8 pfu	показана более высокая вируснейтрализующая способность мАт против сайта \emptyset белка F в сравнении с мАт против сайта II (экспериментальный аналог palivizumab)
Роль интерферонов			
[81]	BALB/c; PCV A2	10^5 – 10^7 pfu	показана роль STAT1 (транскрипционный фактор, необходимый для передачи внутриклеточного сигнала от рецепторов IFN I и II) в антивирусной защите от РСВ-инфекции: нокаут гена <i>STAT1</i> приводил к увеличению вирусной нагрузки в лёгких, усилению ГРБ, гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием, инфильтрации лёгких провоспалительными клетками; продукция Muc5ac (главный компонент секрета эпителия бронхов), а также цитокинов IL-5, IL-13, IFN γ и IL-17A возрастала у инфицированных мышей после нокаута гена <i>STAT1</i>
[63]	C57BL/6; нокаутные по генам, кодирующим TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 и MyD88/ PCV A2	$2,4 \times 10^6$ pfu	показана способность РСВ взаимодействовать с TLR-рецепторами и активировать врождённый иммунитет: нокаут <i>TLR2</i> и <i>TLR6</i> приводил к снижению инфильтрации лёгких нейтрофилами и увеличению вирусной нагрузки; РСВ связывается с TLR2 и TLR6 и активирует NF- κ B-зависимую продукцию цитокинов и хемокинов, но не IFN-I; РСВ индуцировал продукцию IFN-I макрофагами по TLR3-зависимому пути

Ссылка	Линия мышей; штамм РСВ	Доза РСВ, pfu на г веса тела	Тип клеток
[84]	Неонатальные BALB/c; РСВ A2	2×10^5 ТЦД ₅₀	показан aberrantный интерфероновый ответ на РСВ-инфекцию у неонатальных мышей, что способствует развитию Th2-опосредованной иммунопатологии легких: экспрессия IFN α и IFN β в лёгких половозрелых мышей была в 2–4 раза выше в сравнении с неонатальными; количество интерферон-продуцирующих плазматоидных ДК в лёгких половозрелых мышей было в 10 раз больше в сравнении с неонатальными; введение IFN α неонатальным мышам до инфекции приводило к снижению ГРБ и иммунопатологии лёгких, а также к уменьшению количества Th2-клеток и продуцируемых ими цитокинов (IL-4 и IL-13), при этом влияния на уровень Th1-цитокинов (IFN γ и IL-12) не выявлено
[85]	Неонатальные BALB/c; РСВ A2	2×10^5 ТЦД ₅₀	показана двойственная роль IFN α как антивирусного агента и активатора адаптивного иммунитета: интраназальное введение неонатальным мышам IFN α приводило к снижению вирусной нагрузки после первичной инфекции и уменьшению воспаления в лёгких после реинфекции; неонатальные мыши в отличие от половозрелых не продуцируют мукозальные IgA-антитела в дыхательных путях после РСВ-инфекции, однако введение экзогенного IFN α активирует продукцию протективных IgA

Роль цитокинов

[91]	Balb/cJ; РСВ line 19	$1,5 \times 10^6$ pfu	интраназальное введение IFN γ снижает вирусную нагрузку в лёгких, но увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов и хемокина (IL-6 и CXCL1)
[92]	C57BL/6 и BALB/c; РСВ A2	10^6 pfu	показана протективная роль IFN γ в отношении РСВ-инфекции: нокаут гена, кодирующего IFN γ , приводил к увеличению репликации РСВ как после первичной, так и после вторичной инфекции
[61]	BALB/c; РСВ A2	10^6 pfu	показана благоприятная роль IL-10 в РСВ-индуцированном воспалении лёгких: РСВ-инфекция вызывает увеличение продукции IL-10 CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-клетками респираторного тракта; нокаут гена <i>IL-10</i> усиливал иммунопатологию лёгких, но не влиял на репликацию вируса
[41]	BALB/cJ; РСВ A2, РСВ line 19	10^5 – 10^7 pfu	впервые показана роль IL-13 в индукции гиперреактивности бронхов при РСВ-инфекции: оба штамма РСВ (<i>line 19</i> и <i>A2</i>) индуцировали воспаление в лёгких, при этом <i>line 19</i> , но не <i>A2</i> индуцировал экспрессию IL-13, ГРБ и гиперсекрецию слизи; нокаут гена <i>IL-13</i> приводил к значительному снижению ГРБ и гиперсекреции слизи
[97]	BALB/c; РСВ штаммы 01/2-20, 12/11-19 и 12/12-6	3×10^6 pfu	показана роль TSLP в развитии ГРБ и продукции слизи при РСВ-инфекции: РСВ-инфекция увеличивает экспрессию IL-13 и количество ILC2, продуцирующих данный цитокин; мыши, нокаутные по гену рецептора для TSLP (TSLPR), демонстрируют увеличение продукции IL-13, а также усиление ГРБ и гиперпродукции слизи; нокаут гена <i>TSLPR</i> не влияет на интенсивность репликации РСВ
[98]	BALB/c; РСВ line 19	10^5 pfu	показана роль IL-17A в патогенезе РСВ-индуцированного воспаления: РСВ индуцирует экспрессию гена <i>IL-17A</i> , но не <i>IL-17F</i> CD4 ⁺ Т-клетками; нейтрализация IL-17A с помощью мАт или нокаут гена <i>IL-17A</i> не влияют на ГРБ, но приводят к снижению гиперсекреции слизи и интенсивности репликации вируса в дыхательных путях; нокаут гена <i>IL-17A</i> приводит к уменьшению инфильтрации лёгких нейтрофилами
[99]	BALB/c; РСВ A2	8×10^5 pfu	продемонстрирована способность IL-6 и IL-27 подавлять вирус-индуцированное воспаление: экспрессия IL-6 и IL-27 в респираторном тракте увеличивается при РСВ-инфекции; инаktivация IL-6 и IL-27 мАт приводила к увеличению количества CD8 Т-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины TNF α и IFN γ , что усиливало патологические процессы в лёгких; введение IL-27 способствует созреванию Treg и ослаблению воспалительного процесса

Окончание таблицы

Ссылка	Линия мышей; штамм РСВ	Доза РСВ, pfu	Тип клеток
[104]	Неонатальные BALB/c; РСВ A2	2×10^5 ТЦД ₅₀ на г веса тела	показана роль IL-33 в РСВ-инфекции: экспрессия IL-13 и IL-33 в лёгких неонатальных мышей значительно выше в сравнении с половозрелыми; при инфекции неонатальных мышей количество IL2 в лёгких возрастало в 3–4 раза, что не наблюдалось у половозрелых; нейтрализация IL-33 мАт у неонатальных мышей приводила к снижению количества IL2, экспрессии IL-13 и патологии в лёгких, но не влияла на вирусную нагрузку; введение рекомбинантного IL-33 на фоне РСВ-инфекции усиливало патологические процессы в респираторном тракте; нокаут гена, кодирующего ST2-рецептор для IL-33, полностью нивелировал Th2-опосредованную иммунопатологию лёгких при РСВ-инфекции
Роль АФК			
[107]	BALB/c; РСВ A2	5×10^6 pfu	показана роль гена, кодирующего фактор IRG1, и активных форм кислорода в воспалении легких и повреждении тканей при РСВ-инфекции: инфекция РСВ активирует ген <i>IRG1</i> , регулирующий образование АФК в лёгких; нокаут гена <i>IRG1</i> молекулами миРНК уменьшает продукцию АФК в лёгких и нивелирует воспаление

воляет воссоздавать основные клинически значимые проявления патологии: гиперреактивность бронхов, гиперсекрецию слизи, инфильтрацию лёгких провоспалительными клетками (главным образом, лимфоцитами и макрофагами). Исследования, проведённые на этих моделях, внесли значительный вклад в понимание молекулярных и клеточных механизмов патогенеза РСВ-инфекции.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10002).

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

- Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, J., et al. (2018) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *Lancet Infect. Dis.*, **18**, 1191–1210, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4.
- Fauroux, B., Simões, E. A. F., Checchia, P. A., Paes, B., Figueras-Aloy, J., et al. (2017) The burden and long-term respiratory morbidity associated with respiratory syncytial virus infection in early childhood, *Infect. Dis. Ther.*, **6**, 173–197, doi: 10.1007/s40121-017-0151-4.
- Shi, T., Denouel, A., Tietjen, A. K., Campbell, I., Moran, E., Li, X., et al. (2019) Global disease burden estimates of respiratory syncytial virus-associated acute respiratory infection in older adults in 2015: a systematic review and meta-analysis, *J. Infect. Dis.*, **222**, S577–S583, doi: 10.1093/infdis/jiz059.
- Ebbert, J. O., and Limper, A. H. (2005) Respiratory syncytial virus pneumonia in immunocompromised adults: clinical features and outcome, *Respiration*, **72**, 263–269, doi: 10.1159/000085367.
- Edwards, M. R., Walton, R. P., Jackson, D. J., Feleszko, W., Skevaki, C., et al. (2017) The potential of anti-infectives and immunomodulators as therapies for asthma and asthma exacerbations, *Allergy*, **73**, 50–63, doi: 10.1111/all.13257.
- Shi, T., McAllister, D. A., O'Brien, K. L., Simoes, E. A. F., Madhi, S. A., et al. (2017) Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study, *Lancet*, **390**, 946–958, doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8.
- Halasa, N. B., Williams, J. V., Wilson, G. J., Walsh, W. F., Schaffner, W., and Wright, P. F. (2005) Medical and economic impact of a respiratory syncytial virus outbreak in a neonatal intensive care unit, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **24**, 1040–1044, doi: 10.1097/01.inf.0000190027.59795.ac.
- Muralidharan, A., Li, C., Wang, L., and Li, X. (2017) Immunopathogenesis associated with formaldehyde-inactivated RSV vaccine in preclinical and clinical studies, *Expert Rev. Vaccines*, **16**, 351–360, doi: 10.1080/14760584.2017.1260452.
- Wang, D., Cummins, C., Bayliss, S., Sandercock, J., and Burls, A. (2008) Immunoprophylaxis against respiratory syncytial virus (RSV) with palivizumab in children: a systematic review and economic evaluation, *Health Technol. Assess.*, **12**, 1–86, doi: 10.3310/hta12360.
- Mazur, N. I., Higgins, D., Nunes, M. C., Melero, J. A., Langedijk, A. C., et al. (2018) The respiratory syncytial

- virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates, *Lancet Infect. Dis.*, **18**, e295-e311, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30292-5.
11. Khaitov, M. R., Litvin, L. S., Shilovskiy, I. P., Bashkatova, Yu. N., Fayzuloev, E. B., and Zverev, V. V. (2010) RNA interference. New approaches to develop antivirals [in Russian], *Immunologiya*, **31**, 69-76.
 12. Osminkina, L. A., Timoshenko, V. Y., Shilovsky, I. P., Kornilaeva, G. V., Shevchenko, S. N., et al. (2014) Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses, *J. Nanoparticle Res.*, **16**, 1-10, doi: 10.1007/s11051-014-2430-2.
 13. Shilovskiy, I. P., Andreev, S. M., Kozhikhova, K. V., Nikolskii, A. A., and Khaitov, M. R. (2019) Prospects for the use of peptides against respiratory syncytial virus, *Mol. Biol.*, **53**, 484-500, doi: 10.1134/S0026893319040125.
 14. Heylen, E., Neyts, J., and Jochmans, D. (2017) Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery, *Biochem. Pharmacol.*, **127**, 1-12, doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.014.
 15. DeVincenzo, J., Lambkin-Williams, R., Wilkinson, T., Cehelsky, J., Nochur, S., et al. (2010) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8800-8805, doi: 10.1073/pnas.0912186107.
 16. Taylor, G. (2017) Animal models of respiratory syncytial virus infection, *Vaccine*, **35**, 469-480, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.054.
 17. Altamirano-Lagos, M. J., Díaz, F. E., Mansilla, M. A., Rivera-Pérez, D., Soto, D., et al. (2019) Current animal models for understanding the pathology caused by the respiratory syncytial virus, *Front. Microbiol.*, **10**, 873, doi: 10.3389/fmicb.2019.00873.
 18. Battles, M. B., and McLellan, J. S. (2019) Respiratory syncytial virus entry and how to block it, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 233-245, doi: 10.1038/s41579-019-0149-x.
 19. Bukreyev, A., Yang, L., and Collins, P. L. (2012) The secreted g protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement, *J. Virol.*, **86**, 10880-10884, doi: 10.1128/JVI.01162-12.
 20. Feldman, S. A., Hendry, R. M., and Beeler, J. A. (1999) Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G, *J. Virol.*, **73**, 6610-6617, doi: 10.1128/JVI.73.8.6610-6617.1999.
 21. Tripp, R. A., Jones, L. P., Haynes, L. M., Zheng, H. Q., Murphy, P. M., and Anderson, L. J. (2001) CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein, *Nat. Immunol.*, **2**, 732-738, doi: 10.1038/90675.
 22. Feldman, S. A., Audet, S., and Beeler, J. A. (2000) The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate, *J. Virol.*, **74**, 6442-6447, doi: 10.1128/jvi.74.14.6442-6447.2000.
 23. Behera, A. K., Matsuse, H., Kumar, M., Kong, X., Lockey, R. F., and Mohapatra, S. S. (2001) Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 188-195, doi: 10.1006/bbrc.2000.4093.
 24. Currier, M. G., Lee, S., Stobart, C. C., Hotard, A. L., Villenave, R., et al. (2016) EGFR interacts with the fusion protein of respiratory syncytial virus strain 2-20 and mediates infection and mucin expression, *PLoS Pathog.*, **12**, 1-22, doi: 10.1371/journal.ppat.1005622.
 25. Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T. J., Duan, W., Mastrangelo, P., and Hegele, R. G. (2011) Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus, *Nat. Med.*, **17**, 1132-1135, doi: 10.1038/nm.2444.
 26. Collins, P. L., Fearn, R., and Graham, B. S. (2013) Respiratory syncytial Virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease, in *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines. Current Topics in Microbiology and Immunology* (Anderson, L., and Graham, B., eds) Vol. 372, Springer, Berlin, Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-38919-1_1.
 27. Ralston, S., and Hill, V. (2009) Incidence of apnea in infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis, *J. Pediatr.*, **155**, 728-733, doi: 10.1016/j.jpeds.2009.04.063.
 28. Johnson, J. E., Gonzales, R. A., Olson, S. J., Wright, P. F., and Graham, B. S. (2007) The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection, *Mod. Pathol.*, **20**, 108-119, doi: 10.1038/modpathol.3800725.
 29. Welliver, T. P., Garofalo, R. P., Hosakote, Y., Hintz, K. H., Avendano, L., et al. (2007) Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses, *J. Infect. Dis.*, **195**, 1126-1136, doi: 10.1086/512615.
 30. Smith, P. K., Wang, S. Z., Dowling, K. D., and Forsyth, K. D. (2001) Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis, *J. Paediatr. Child Health.*, **37**, 146-151, doi: 10.1046/j.1440-1754.2001.00618.x.
 31. Rosenberg, H. F., and Domachowske, J. B. (2012) Inflammatory responses to respiratory syncytial virus (RSV) infection and the development of immunomodulatory pharmacotherapeutics, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 1424-1431, doi: 10.2174/092986712799828346.
 32. Stoppelenburg, A. J., De Roock, S., Hennis, M. P., Bont, L., and Boes, M. (2014) Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection, *Am. J. Pathol.*, **184**, 1274-1279, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.033.
 33. Mosquera, R. A., Stark, J. M., Atkins, C. L., Colasurdo, G. N., Chevalier, J., et al. (2014) Functional and immune response to respiratory syncytial virus infection in aged BALB/c mice: a search for genes determining disease severity, *Exp. Lung Res.*, **40**, 40-49, doi: 10.3109/01902148.2013.859334.
 34. Stokes, K. L., Chi, M. H., Sakamoto, K., Newcomb, D. C., Currier, M. G., et al. (2011) Differential pathogenesis of respiratory syncytial virus clinical isolates in BALB/c mice, *J. Virol.*, **85**, 5782-5793, doi: 10.1128/JVI.01693-10.
 35. Prince, G. A., Horswood, R. L., Berndt, J., Suffin, S. C., and Chanock, R. M. (1979) Respiratory syncytial virus infection in inbred mice, *Infect. Immun.*, **26**, 764-766, doi: 10.1128/IAI.26.2.764-766.1979.
 36. Taylor, G., Stott, E. J., Hughes, M., and Collins, A. P. (1984) Respiratory syncytial virus infection in mice, *Infect. Immun.*, **43**, 649-655, doi: 10.1128/IAI.43.2.649-655.1984.
 37. Graham, B. S., Perkins, M. D., Wright, P. F., and Karzon, D. T. (1988) Primary respiratory syncytial virus infection in mice, *J. Med. Virol.*, **26**, 153-162, doi: 10.1002/jmv.1890260207.
 38. Rameix-Welti, M. A., Le Goffic, R., Hervé, P. L., Sourimant, J., Rémot, A., et al. (2014) Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice, *Nat. Commun.*, **5**, 5104, doi: 10.1038/ncomms6104.
 39. Jafri, H. S., Chávez-Bueno, S., Mejías, A., Gómez, A. M., Ríos, A., et al. (2004) Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice, *J. Infect. Dis.*, **189**, 1856-1865, doi: 10.1086/386372.

40. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005) Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA, *Nat. Med.*, **11**, 50-55, doi: 10.1038/nm1164.
41. Lukacs, N. W., Moore, M. L., Rudd, B. D., Berlin, A. A., Collins, R. D., et al. (2006) Differential immune responses and pulmonary pathophysiology are induced by two different strains of respiratory syncytial virus, *Am. J. Pathol.*, **169**, 977-986, doi: 10.2353/ajpath.2006.051055.
42. Moore, M. L., Chi, M. H., Luongo, C., Lukacs, N. W., Polosukhin, V. V., et al. (2009) A chimeric A2 strain of respiratory syncytial virus (RSV) with the fusion protein of RSV strain *line 19* exhibits enhanced viral load, mucus, and airway dysfunction, *J. Virol.*, **83**, 4185-4194, doi: 10.1128/JVI.01853-08.
43. Shilovskiy, I. P., Nikolskii, A. A., Nikonova, A. A., Gaisina, A. R., Vishniakova, L. I., et al. (2019) Respiratory syncytial virus infection in mice inducing airway dysfunction associated with lung tissue inflammation as a model of human pathology, *Immunologiya*, **40**, 72-83, doi: 10.24411/0206-4952-2019-15008.
44. Cannon, M. J., Stott, E. J., Taylor, G., and Askonas, B. A. (1987) Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells, *Immunology*, **62**, 133-138.
45. Jozwik, A., Habibi, M. S., Paras, A., Zhu, J., Guvenel, A., et al. (2015) RSV-specific airway resident memory CD8⁺ T cells and differential disease severity after experimental human infection, *Nat. Commun.*, **6**, 10224, doi: 10.1038/ncomms10224.
46. Schmidt, M. E., and Varga, S. M. (2018) The CD8 T cell response to respiratory virus infections, *Front. Immunol.*, **9**, 678, doi: 10.3389/fimmu.2018.00678.
47. Schmidt, M. E., and Varga, S. M. (2018) Cytokines and CD8 T cell immunity during respiratory syncytial virus infection, *Cytokine*, **133**, 15448, doi: 10.1016/j.cyto.2018.07.012.
48. Russell, C. D., Unger, S. A., Walton, M., and Schwarze, J. (2017) The human immune response to respiratory syncytial virus infection, *Clin. Microbiol. Rev.*, **30**, 481-502, doi: 10.1128/CMR.00090-16.
49. Morabito, K. M., Ruckwardt, T. R., Redwood, A. J., Moin, S. M., Price, D. A., and Graham, B. S. (2017) Intranasal administration of RSV antigen-expressing MCMV elicits robust tissue-resident effector and effector memory CD8⁺ T cells in the lung, *Mucosal Immunol.*, **10**, 545-554, doi: 10.1038/mi.2016.48.
50. Cannon, M. J., Openshaw, P. J. M., and Askonas, B. A. (1988) Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus, *J. Exp. Med.*, **168**, 1163-1168, doi: 10.1084/jem.168.3.1163.
51. Graham, B. S., Bunton, L. A., Wright, P. F., and Karzon, D. T. (1991) Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice, *J. Clin. Investig.*, **88**, 1026-1033, doi: 10.1172/JCI115362.
52. Schmidt, M. E., Knudson, C. J., Hartwig, S. M., Pewe, L. L., Meyerholz, D. K., et al. (2018) Memory CD8 T cells mediate severe immunopathology following respiratory syncytial virus infection, *PLoS Pathog.*, **14**, doi: 10.1371/journal.ppat.1006810.
53. Ostler, T., Davidson, W., and Ehl, S. (2002) Virus clearance and immunopathology by CD8⁺ T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN- γ , *Eur. J. Immunol.*, **32**, 2117-2123, doi: 10.1002/1521-4141(200208)32:8<2117::AID-IMMU2117>3.0.CO;2-C.
54. Slütter, B., Pewe, L. L., Kaech, S. M., and Harty, J. T. (2013) Lung airway-surveillance CXCR3hi memory CD8⁺ T cells are critical for protection against influenza A virus, *Immunity*, **39**, 939-948, doi: 10.1016/j.immuni.2013.09.013.
55. Channappanavar, R., Fett, C., Zhao, J., Meyerholz, D. K., and Perlman, S. (2014) Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection, *J. Med. Virol.*, **88**, 11034-11044, doi: 10.1128/JVI.01505-14.
56. Connors, T. J., Ravindranath, T. M., Bickham, K. L., Gordon, C. L., Zhang, F., et al. (2016) Airway CD8⁺ T cells are associated with lung injury during infant viral respiratory tract infection, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **54**, 822-830, doi: 10.1165/rcmb.2015-0297OC.
57. El Saleeby, C. M., Suzich, J., Conley, M. E., and DeVincenzo, J. P. (2004) Quantitative effects of palivizumab and donor-derived T cells on chronic respiratory syncytial virus infection, lung disease, and fusion glycoprotein amino acid sequences in a patient before and after bone marrow transplantation, *Clin. Infect. Dis.*, **39**, 17-20, doi: 10.1086/421779.
58. Fulton, R. B., Meyerholz, D. K., and Varga, S. M. (2010) Foxp3 + CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection, *Eur. J. Immunol.*, **185**, 2382-2392, doi: 10.4049/jimmunol.1000423.
59. Liu, J., Ruckwardt, T. J., Chen, M., Nicewonger, J. D., Johnson, T. R., and Graham, B. S. (2010) Epitope-specific regulatory CD4 T cells reduce virus-induced illness while preserving CD8 T-cell effector function at the site of infection, *J. Virol.*, **84**, 10501-10509, doi: 10.1128/JVI.00963-10.
60. Sun, J., Madan, R., Karp, C. L., and Braciale, T. J. (2009) Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10, *Nat. Med.*, **15**, 277-284, doi: 10.1038/nm.1929.
61. Loebbermann, J., Schnoeller, C., Thornton, H., Durant, L., Sweeney, N. P., et al. (2012) IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice, *PLoS One.*, **7**, doi: 10.1371/journal.pone.0032371.
62. Kinnear, E., Lambert, L., McDonald, J. U., Cheeseman, H. M., Caproni, L. J., and Tregoning, J. S. (2018) Airway T cells protect against RSV infection in the absence of antibody, *Mucosal Immunol.*, **11**, 249-256, doi: 10.1038/mi.2017.79.
63. Murawski, M. R., Bowen, G. N., Cerny, A. M., Anderson, L. J., Haynes, L. M., et al. (2009) Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2, *J. Virol.*, **83**, 1492-1500, doi: 10.1128/JVI.00671-08.
64. Morrison, P. T., Thomas, L. H., Sharland, M., and Friedland, J. S. (2007) RSV-infected airway epithelial cells cause biphasic up-regulation of CCR1 expression on human monocytes, *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 87-95, doi: 10.1189/jlb.1006611.
65. Bagga, B., Cehelsky, J. E., Vaishnav, A., Tomwilkinson, T., Meyers, R., et al. (2015) Effect of preexisting serum and mucosal antibody on experimental respiratory syncytial virus (RSV) challenge and infection of adults, *J. Infect. Dis.*, **212**, 1719-1725, doi: 10.1093/infdis/jiv281.
66. Habibi, M. S., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., et al. (2015) Impaired antibody-mediated protection and defective IgA b-cell memory in experimental infection of adults with respiratory syncytial virus, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **191**, 1040-1049, doi: 10.1164/rccm.201412-2256OC.
67. Graham, B. S. (2019) Immunological goals for respiratory syncytial virus vaccine development, *Immunity*, **51**, 429-442, doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.007.

68. Mousa, J. J., Kose, N., Matta, P., Gilchuk, P., and Crowe, J. E. (2017) A novel pre-fusion conformation-specific neutralizing epitope on the respiratory syncytial virus fusion protein, *Nat. Microbiol.*, **2**, 16271, doi: 0.1038/nmicrobiol.2016.271.
69. Gilman, M. S. A., Castellanos, C. A., Chen, M., Ngwuta, J. O., Goodwin, E., et al. (2016) Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors, *Sci. Immunol.*, **1**, doi: 10.1126/sciimmunol.aaj1879.
70. Zhao, M., Zheng, Z. Z., Chen, M., Modjarrad, K., Zhang, W., et al. (2017) Discovery of a prefusion respiratory syncytial virus F-specific monoclonal antibody that provides greater *in vivo* protection than the murine precursor of palivizumab, *J. Virol.*, **91**, e00176-17, doi: 10.1128/JVI.00176-17.
71. Jones, H. G., Ritschel, T., Pascual, G., Brakenhoff, J. P. J., Keogh, E., et al. (2018) Structural basis for recognition of the central conserved region of RSV G by neutralizing human antibodies, *PLoS Pathog.*, **14**, doi: 10.1371/journal.ppat.1006935.
72. Caidi, H., Miao, C., Thornburg, N. J., Tripp, R. A., Anderson, L. J., and Haynes, L. M. (2018) Anti-respiratory syncytial virus (RSV) G monoclonal antibodies reduce lung inflammation and viral lung titers when delivered therapeutically in a BALB/c mouse model, *Antiviral Res.*, **154**, 149-157, doi: 10.1016/j.antiviral.2018.04.014.
73. Lee Chung, H., and Jang, Y. Y. (2016) High serum ige level in the children with acute respiratory syncytial virus infection is associated with severe disease, *Clin. Microbiol. Rev.*, **30**, 481-502, doi: 10.1128/CMR.00090-16.
74. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015) Type I interferons in infectious disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 87-103, doi: 10.1038/nri3787.
75. Khaitov, M. R., Shilovskiy, I. P., and Khaitov, R. M. (2010) Type III interferons [in Russian], *Usp. Sovr. Biol.*, **130**, 147-153.
76. Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., et al. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus, *Nat. Immunol.*, **1**, 398-401, doi: 10.1038/80833.
77. Zeng, R., Cui, Y., Hai, Y., and Liu, Y. (2012) Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines, *Virus Res.*, **167**, 138-145, doi: 10.1016/j.virusres.2012.06.003.
78. Rudd, B. D., Burstein, E., Duckett, C. S., Li, X., and Lukacs, N. W. (2005) Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression, *J. Med. Virol.*, **79**, 3350-3357, doi: 10.1128/JVI.79.6.3350-3357.2005.
79. Lukacs, N. W., Smit, J. J., Mukherjee, S., Morris, S. B., Nunez, G., and Lindell, D. M. (2010) Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation, *Eur. J. Immunol.*, **185**, 2231-2239, doi: 10.4049/jimmunol.1000733.
80. Bhoj, V. G., Sun, Q., Bhoj, E. J., Somers, C., Chen, X., et al. (2008) MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14046-14051, doi: 10.1073/pnas.0804717105.
81. Hashimoto, K., Durbin, J. E., Zhou, W., Collins, R. D., Ho, S. B., et al. (2005) Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 550-557, doi: 10.1016/j.jaci.2005.03.051.
82. Selvaggi, C., Pierangeli, A., Fabiani, M., Spano, L., Nicolai, A., et al. (2014) Interferon lambda 1-3 expression in infants hospitalized for RSV or HRV associated bronchiolitis, *J. Infect.*, **68**, 467-477, doi: 10.1016/j.jinf.2013.12.010.
83. Sun, Y., Jain, D., Koziol-White, C. J., Genoyer, E., Gilbert, M., et al. (2015) Immunostimulatory defective viral genomes from respiratory syncytial virus promote a strong innate antiviral response during infection in mice and humans, *PLoS Pathog.*, **11**, doi: 10.1371/journal.ppat.1005122.
84. Cormier, S. A., Shrestha, B., Saravia, J., Lee, G. I., Shen, L., et al. (2014) Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection, *J. Med. Virol.*, **88**, 9350-9360, doi: 10.1128/JVI.00818-14.
85. Hijano, D. R., Siefker, D. T., Shrestha, B., Jaligama, S., Vu, L. D., et al. (2018) Type I interferon potentiates IgA immunity to respiratory syncytial virus infection during infancy, *Sci. Rep.*, **8**, 11034, doi: 10.1038/s41598-018-29456-w.
86. Goritzka, M., Makris, S., Kausar, F., Durant, L. R., Pereira, C., et al. (2015) Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes, *J. Exp. Med.*, **212**, 699-714, doi: 10.1084/jem.20140825.
87. Scotta, M. C., Machado, D. G., Oliveira, S. G., de Moura, A., Estorgato, G. R., et al. (2019) Evaluation of nasal levels of interferon and clinical severity of influenza in children, *J. Clin. Virol.*, **114**, 37-42, doi: 10.1016/j.jcv.2019.02.003.
88. Yu, C. F., Peng, W.-M., Schlee, M., Barchet, W., Eishübing, A. M., et al. (2018) SOCS1 and SOCS3 target IRF7 degradation to suppress TLR7-mediated type I IFN production of human plasmacytoid dendritic cells, *Eur. J. Immunol.*, **200**, 4024-4035, doi: 10.4049/jimmunol.1700510.
89. Christiaansen, A. F., Syed, M. A., Ten Eyck, P. P., Hartwig, S. M., Durairaj, L., et al. (2016) Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants, *Pediatr. Res.*, **80**, 702-709, doi: 10.1038/pr.2016.130.
90. Thwaites, R. S., Coates, M., Ito, K., Ghazaly, M., Feather, C., et al. (2018) Reduced nasal viral load and IFN responses in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis and respiratory failure, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **198**, 1074-1084, doi: 10.1164/rccm.201712-2567OC.
91. Eichinger, K. M., and Empey, K. M. (2017) Data describing IFN γ -mediated viral clearance in an adult mouse model of respiratory syncytial virus (RSV), *Data Brief*, **14**, 272-277, doi: 10.1016/j.dib.2017.07.034.
92. Lee, Y. M., Miyahara, N., Takeda, K., Prpich, J., Oh, A., et al. (2008) IFN- γ production during initial infection determines the outcome of reinfection with respiratory syncytial virus, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **177**, 208-218, doi: 10.1164/rccm.200612-1890OC.
93. Mejias, A., Dimo, B., Suarez, N. M., Garcia, C., Suarez-Arrabal, M. C., et al. (2013) Whole blood gene expression profiles to assess pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection, *PLoS Med.*, **10**, doi: 10.1371/journal.pmed.1001549.
94. Tang, Y. W., and Graham, B. S. (1994) Anti-IL-4 treatment at immunization modulates cytokine expression, reduces illness, and increases cytotoxic T lymphocyte activity in mice challenged with respiratory syncytial virus, *J. Clin. Invest.*, **94**, 1953-1958, doi: 10.1172/JCI117546.
95. Vu, L. D., Siefker, D., Jones, T. L., You, D., Taylor, R., et al. (2019) Elevated levels of type 2 respiratory innate lymphoid cells in human infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **200**, 1414-1423, doi: 10.1164/rccm.201812-2366OC.

96. Bukreyev, A., Belyakov, I. M., Prince, G. A., Yim, K. C., Harris, K. K., et al. (2005) Expression of interleukin-4 by recombinant respiratory syncytial virus is associated with accelerated inflammation and a nonfunctional cytotoxic T-lymphocyte response following primary infection but not following challenge with wild-type virus, *J. Virol.*, **79**, 9515-9526, doi: 10.1128/JVI.79.15.9515-9526.2005.
97. Stier, M. T., Bloodworth, M. H., Toki, S., Newcomb, D. C., Goleniewska, K., et al. (2016) Respiratory syncytial virus infection activates IL-13-producing group 2 innate lymphoid cells through thymic stromal lymphopoietin, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**, 814-824, doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.050.
98. Mukherjee, S., Lindell, D. M., Berlin, A. A., Morris, S. B., Shanley, T. P., et al. (2011) IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease, *Am. J. Pathol.*, **179**, 248-258, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.003.
99. Pyle, C. J., Uwadiae, F. I., Swieboda, D. P., and Harker, J. A. (2017) Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology, *PLoS Pathog.*, **13**, doi: 10.1371/journal.ppat.1006640.
100. Antwi-Amoabeng, D., Kanji, Z., Ford, B., Beutler, B. D., Riddle, M. S., and Siddiqui, F. (2020) Clinical outcomes in COVID-19 patients treated with tocilizumab: an individual patient data systematic review, *J. Med. Virol.*, doi: 10.1002/jmv.26038.
101. Lan, S. H., Lai, C. C., Huang, H. T., Chang, S. P., Lu, L. C., and Hsueh, P. R. (2020) Tocilizumab for severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **56**, 106103, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106103.
102. Pacha, O., Sallman, M. A., and Evans, S. E. (2020) COVID-19: a case for inhibiting IL-17? *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 345-346, doi: 10.1038/s41577-020-0328-z.
103. Shilovskiy, I., Nikolskii, A., Kurbacheva, O., and Khaitov, M. (2020) Modern view of neutrophilic asthma molecular mechanisms and therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 854-868, doi: 10.1134/S0006297920080027.
104. Saravia, J., You, D., Shrestha, B., Jaligama, S., Siefker, D., et al. (2015) Respiratory syncytial virus disease is mediated by age-variable IL-33, *PLoS Pathog.*, **11**, doi: 10.1371/journal.ppat.1005217.
105. Krasnikh, L. M., Gaisina, A. R., Shilovskiy, I. P., Nikonova, A. A., Mitin, A. N., et al. (2018) The study of pharmacological efficiency of sirna targeted to il-33 on the mouse model of virus-induced exacerbations of bronchial asthma, *Russ. J. Biopharm.*, **10**, 49-55.
106. Liu, T., Castro, S., Brasier, A. R., Jamaluddin, M., Garofalo, R. P., and Casola, A. (2004) Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: role of tyrosine phosphatases, *J. Biol. Chem.*, **279**, 2461-2469, doi: 10.1074/jbc.M307251200.
107. Ren, K., Lv, Y., Zhuo, Y., Chen, C., Shi, H., et al. (2016) Suppression of IRG-1 reduces inflammatory cell infiltration and lung injury in respiratory syncytial virus infection by reducing production of reactive oxygen species, *J. Virol.*, **90**, 7313-7322, doi: 10.1128/JVI.00563-16.

MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRAL INFECTION. UNDERSTANDING HUMAN PATHOLOGY BY MURINE MODELS

Review

I. P. Shilovskiy*, K. V. Yumashev, A. A. Nikolsky, L. I. Vishnyakova, and M. R. Khaitov

*National Research Center - Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency,
115522 Moscow, Russia; E-mail: ip.shilovskiy@nrcci.ru*

Respiratory syncytial virus (RSV) causes severe illness of the lower respiratory tract in infants, immunocompromised people, and elderly. Despite decades of research, there is no licensed vaccine against RSV, and many therapeutic drugs are still under development. Detailed understanding of molecular and cellular mechanisms of the RSV infection pathology can accelerate the development of efficacious treatment. Current studies on the RSV pathogenesis are based on the analysis of biopsies from the infected patients; however deeper understanding of molecular and cellular mechanisms of the RSV pathology could be obtained using animal models. Mice are the most often used model for RSV infection because they exhibit manifestations similar to those observed in humans (bronchial obstruction, mucous hypersecretion, and pulmonary inflammation mediated by lymphocytes, macrophages, and neutrophils). Also, the use of mice is economically feasible, and many molecular tools are available for studying RSV infection pathogenesis at the molecular and cellular levels. This review summarizes new data on the pathogenesis of RSV infection obtained in mouse models, which demonstrated the role of T cells in both the antiviral defense and the development of lung immunopathology. T cells not only eliminate the infected cells, but also produce significant amounts of the proinflammatory cytokines TNF α and IFN γ . Recently, a new subset of tissue-resident memory T cells (T_{RM}) was identified that provide a strong antiviral defense without induction of lung immunopathology. These cells accumulate in the lungs after local rather than systemic administration of RSV antigens, which suggests new approaches to vaccination. The studies in mouse models have revealed a minor role of interferons in the anti-RSV protection, as RSV possesses mechanisms to escape the antiviral action of type I and III interferons, which may explain the low efficacy of interferon-containing drugs. Using knockout mice, a significant breakthrough has been achieved in understanding the role of many pro-inflammatory cytokines in lung immunopathology. It was found that in addition to TNF α and IFN γ , the cytokines IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-33, and TSLP mediate the major manifestations of the RSV pathogenesis, such as bronchial obstruction, mucus hyperproduction, and lung infiltration by pro-inflammatory cells, while IL-6, IL-10, and IL-27 exhibit the anti-inflammatory effect. Despite significant differences between the mouse and human immune systems, mouse models have made a significant contribution to the understanding of molecular and cellular mechanisms of the pathology of human RSV infection.

Keywords: molecular mechanisms, respiratory syncytial virus, pathogenesis, experimental models

УДК 577.15;577.29

МУТАЦИИ В ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЕ DNMT3A ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Обзор

© 2021 Д.А. Храброва^{1*}, М.Г. Якубовская², Е.С. Громова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: khrabrova_da@mail.ru

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.07.2020

После доработки 08.10.2020

Принята к публикации 15.10.2020

У млекопитающих метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией, необходимой для регуляции экспрессии генов, поддержания стабильности генома и других процессов. При канцерогенезе наблюдаются изменения как в генах ДНК-метилтрансфераз (МТаз), так и в паттерне (рисунке) метилирования ДНК, и часто они ассоциированы с плохим прогнозом выживаемости пациентов. МТазы DNMT3A человека, ответственная за *de novo* метилирование ДНК, является одним из ферментов, в котором часто происходят мутации уже на ранних стадиях канцерогенеза. Они часто выявляются при злокачественных гематологических заболеваниях, в особенности при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) с преимущественной распространенностью мутации R882H. Биохимическая характеристика мутантных форм МТазы DNMT3A необходима для понимания потенциальных последствий этих изменений для функционирования фермента. В обзоре описаны известные на сегодняшний день нарушения в DNMT3A, характерные для ОМЛ, с более подробным анализом мутаций в каталитическом домене фермента. Особое внимание уделено молекулярным механизмам функционирования DNMT3A при наличии R882H и менее распространенных мутаций как на модельных ДНК-субстратах, так и на линиях опухолевых клеток. Понимание общих закономерностей функционирования DNMT3A при наличии различных мутаций будет способствовать совершенствованию ранней диагностики гематологических заболеваний и персонализированной терапии рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a, метилирование ДНК, мутации, острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром, гематологические заболевания.

DOI: 10.31857/S0320972521030064

ВВЕДЕНИЕ

Метилирование ДНК – важная эпигенетическая модификация, необходимая для регуляции многих клеточных процессов как у прокариот, так и у эукариот [1, 2]. У эукариот с метилированием ДНК связаны такие важнейшие процессы, как регуляция экспрессии генов, защита генома от мобильных генетических элементов, импринтинг генов, инактивация X-хромосомы и др. [1, 2]. За метилирование ДНК во всех организмах ответственны ферменты се-

мейства ДНК-метилтрансфераз. У эукариот ДНК-метилтрансферазы (МТазы) Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b осуществляют перенос метильной группы с кофактора S-аденозил-L-метионина (AdoMet) на атом углерода C5 в остатке цитозина в CpG-последовательности ДНК [1]. Dnmt3a и Dnmt3b ответственны за *de novo* метилирование ДНК. Таким образом, они создают паттерн (рисунок) метилирования, заключающийся в определенном чередовании метилированных и неметилированных CpG-последовательностей и поддерживающийся далее МТазой Dnmt1 [2]. Метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией, в результате которой повторяющиеся и мобильные элементы генома (транспозоны, эндогенные ретровирусы и микросателлиты) метилированы, а так называемые CpG-островки в промоторных участках генов в основном не метилированы [3]. Аберрантное метилирование (нарушение паттерна метилирования) является од-

Принятые сокращения: МДС – миелодиспластический синдром; МТазы – ДНК-метилтрансферазы; ОЛСТ – острый лейкоз смешанного типа; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ADD – ATRX-DNMT3A/3B-DNMT3L-домен; AdoHcy – S-аденозил-L-гомоцистеин; AdoMet – S-аденозил-L-метионин; Dnmt3a-CD – каталитический домен ДНК-метилтрансферазы DNMT3A; PWWP – Pro-Trp-Trp-Pro-домен; TRD – узнающий домен.

* Адресат для корреспонденции.

ним из факторов, вовлеченных в патогенез многих заболеваний, в том числе приводящих к канцерогенезу [4, 5]. Этот процесс сопряжен с изменениями в самих МТаз.

Обнаружено, что при канцерогенезе МТазы DNMT3A человека является одним из ферментов, в котором наиболее часто происходят мутации уже на ранних стадиях гематологических заболеваний [4, 6–8]. В частности, при развитии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) выявлен ряд точечных мутаций в DNMT3A [8–12]. Опубликовано большое количество исследований по структурно-функциональным особенностям мутантных форм DNMT3A, выявляемых при ОМЛ, затрагивающих также и обусловленные этими особенностями изменения в метилировании ДНК. Чаще всего мутация происходит в триplete, кодирующем R882, что приводит к замене R на H, и эта мутация активно изучается с точки зрения влияния на активность DNMT3A [13–16]. Однако если вопрос о последствиях данной мутации, сказывающихся на функционировании DNMT3A, подробно исследован, то вопрос о том, является ли предложенный молекулярный механизм одним из триггерных нарушений в клетке, до сих пор остаётся дискуссионным [14–17]. Другие мутации, часто встречающиеся при развитии лейкоза (так называемые «не-аргининовые»), менее изучены как с точки зрения их влияния на работу фермента, так и с точки зрения обнаружения связи между мутацией и нарушениями в паттерне метилирования, присущими опухолевым клеткам. Систематизация накопленных данных по биохимической характеристике мутантных форм МТазы DNMT3A необходима для понимания потенциальных последствий этих изменений для функционирования фермента, а также для выявления наблюдаемых противоречий и определения перспектив дальнейших исследований и использования в медицинской практике. В обзоре будет рассмотрено влияние точечных мутаций в гене МТазы DNMT3A, выявляемых при гематологических заболеваниях, на ее функционирование. Особое внимание будет уделено мутациям, обнаруженным при ОМЛ в каталитическом домене фермента.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ФЕРМЕНТЕ: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ DNMT3A

Все эукариотические МТазы (Dnmt1 и семейство Dnmt3) имеют две функциональные части: протяженный N-концевой регуляторный фрагмент и меньший по размеру C-концевой каталитический домен [1, 18–23]. N-Концевой

фрагмент содержит несколько доменов, выполняющих регуляторные функции и обеспечивающих привлечение МТаз к хроматину [20, 24].

В семейство DNMT3 человека (обозначается Dnmt3 – у всех млекопитающих) входят МТазы DNMT3A, её укороченная изоформа DNMT3A2 и МТазы DNMT3B, а также регуляторный фактор DNMT3L (рис 1). DNMT3A представляет собой белок, содержащий 912 а.о., высоко консервативный у позвоночных и имеющий гомологию 98% у человека и мыши. Соответствующий ген локализован на хромосоме человека 2p23 [20]. Регуляторный фрагмент в случае ферментов DNMT3 содержит два важных домена, отвечающих за взаимодействие с хроматином: Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP-домен) и ATRX-DNMT3A/3B-DNMT3L (ADD-домен) (рис. 1) [1]. PWWP-домен обеспечивает привлечение МТаз DNMT3A и DNMT3B к хроматину путём специфического взаимодействия с хвостом гистона H3, содержащим триметилированный остаток K36 (H3K36me3). ADD-Домен специфически узнает и связывается с хвостом гистона H3, не метилированного по остатку K4 (H3K4me0), а также является посредником во взаимодействии с различными белковыми факторами и участвует в аллостерическом контроле активности МТазы DNMT3A [22].

В изоформе DNMT3A2, отличающейся укороченной регуляторной частью, участок а.о. 1–212 заменён на 24 другие аминокислоты, остальная часть молекулы полностью совпадает с основной формой DNMT3A [20] (рис. 1). Роль N-концевого сегмента, отсутствующего у DNMT3A2, до конца не ясна, однако есть предположения, что он участвует в таргетировании DNMT3A к CpG-островкам [21]. Изоформы DNMT3A и DNMT3A2 в клетках тканей человека не экспрессируются одновременно, и, как правило, экспрессируется DNMT3A [20, 21]. В эмбриональных стволовых клетках экспрессируется DNMT3A2, но при дифференцировке происходит подавление экспрессии DNMT3A2 и активация экспрессии DNMT3A [20, 21]. Интересно, что, по некоторым данным, при ОМЛ у отдельных пациентов выявляют транскрипт, соответствующий DNMT3A2, характерный для эмбриональных клеток, в то время как в нормальных миелобластах выявляют транскрипт, соответствующий DNMT3A [25].

C-Концевой домен отвечает за метилирующую активность ферментов; он схож у всех МТаз, включая прокариотические, и содержит десять высоко консервативных мотивов, играющих ключевую роль в реакции метилирования ДНК [20, 23] (рис. 2). C-Концевой домен (Dnmt3a-CD) может функционировать без ре-

гуляторной части МТазы [1]. Dnmt3a-CD мыши часто используют как модель DNMT3A-CD человека. Для прокариотических МТаз известно, что реакция метилирования ДНК включает несколько ключевых стадий: 1) образование комплекса МТазы–ДНК–AdoMet, 2) выпетливание цитозина-мишени из двойной спирали ДНК, 3) образование ковалентной связи между цитозином-мишенью и ферментом в переходном комплексе, 4) перенос метильной группы с AdoMet на цитозин, 5) диссоциация комплекса и высвобождение продуктов реакции [26, 27]. Предполагается, что эукариотические МТазы действуют по аналогичному механизму [1, 20–23]. Аминокислотные остатки, участвующие в выпетливании цитозина-мишени, расположены в области узнающего домена (TRD, Target Recognition Domain) и мотивах IV, VI и VIII. Мотивы I–III образуют вместе сайт связывания кофактора AdoMet. Мотивы IV и VI необходимы для осуществления самой реакции, при этом мотив IV содержит инвариантный остаток цистеина, который атакует цитозин-мишень, в результате чего образуется ковалентный ДНК-белковый интермедиат [23]. Между мотивами VIII и IX находится переменная область TRD, участвующая в узнавании определенной нуклеотидной последовательности в ДНК (CpG – в случае эукариотических ферментов) [1, 20, 23]. Следует отметить, что в случае эукариотической Dnmt3a имеется предпочтение к определенным нуклеотидным последовательностям, фланкирующим CpG-сайт [21].

Для работы МТаз Dnmt3a и Dnmt3b в клетках млекопитающих необходимо присутствие регуляторного фактора Dnmt3-like (Dnmt3L) [20, 27]. Dnmt3L частично гомологичен упомянутым МТазам, но не содержит PWWP-домена и не активен каталитически (рис. 1) [20, 28]. При метилировании ДНК МТазы Dnmt3a (или Dnmt3b) образует активный тетрамер с Dnmt3L [20]. На примере комплекса DNMT3A–DNMT3L человека видно, что тетрамер состоит из двух димеров с субъединицами DNMT3A в центре и субъединицами DNMT3L по краям, при этом ДНК располагается в центре комплекса, а общая структура напоминает бабочку (рис. 3) [20, 28, 29]. Таким образом, в комплексе присутствуют два активных центра, за счет чего возможно метилирование обеих цепей ДНК.

При метилировании не имеющая жёсткого закрепления каталитическая петля движется по малой бороздке ДНК, и Dnmt3L способствует стабилизации её положения, тем самым повышая каталитическую активность МТазы. Кроме того, в свободном комплексе Dnmt3a–Dnmt3L в области TRD наблюдается недостаток электронной плотности, что повышает сродство к отрицательно заряженной ДНК и повышает устойчивость образуемого комплекса при взаимодействии с большой бороздкой ДНК [28, 29]. Для МТаз млекопитающих в комплексе Dnmt3a–Dnmt3L наблюдаются два типа белок-белковых взаимодействий: гидрофобные между четырьмя остатками Р в так называемом FF-интерфейсе при контакте Dnmt3a с

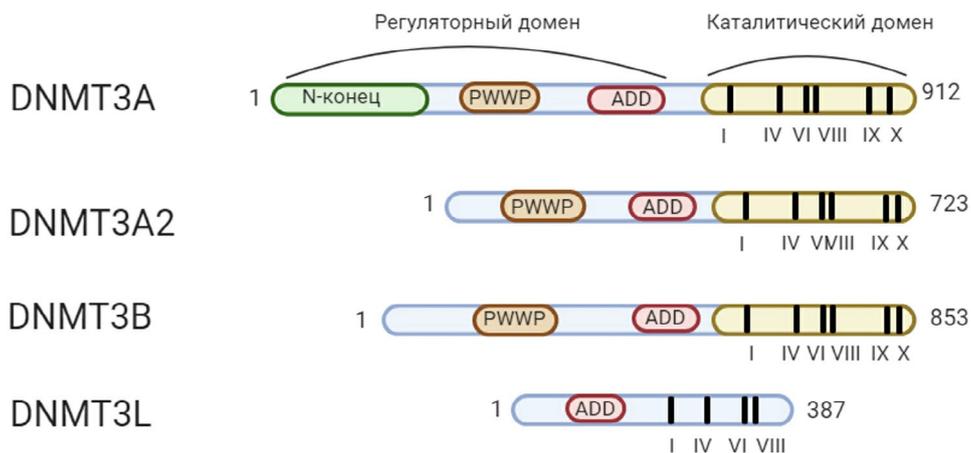


Рис. 1. Строение ДНК-метилтрансфераз человека семейства DNMT3, а также регуляторного фактора DNMT3L. Области, ответственные за одинаковые функции, отмечены одним и тем же цветом, PWWP-домен выделен каштановым, ADD – малиновым, каталитический домен – бледно-желтым; N-концевой участок DNMT3A – светло-зеленым. Высоко консервативные мотивы в каталитическом домене отмечены черным. Справа указано число аминокислотных остатков в белках. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

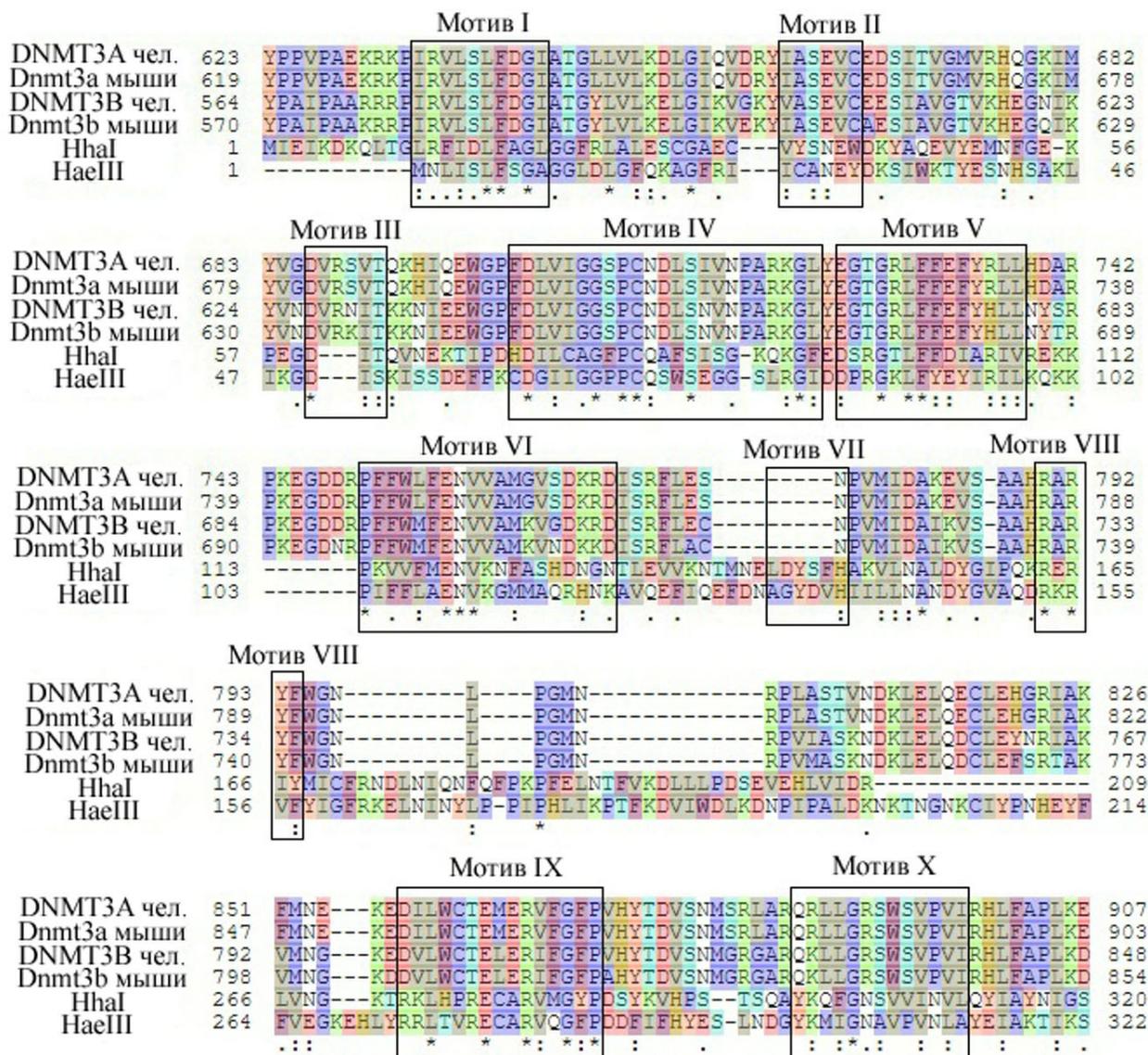


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей каталитических доменов МТаз человека (DNMT3A и DNMT3B), мыши (Dnmt3a и Dnmt3b) и прокариотических МТаз (HhaI и HaeIII). Отмечены консервативные мотивы I–X. Отрицательно заряженные аминокислоты даны на красном фоне, положительно заряженные – на салатном, гидрофобные – на синем, ароматические – на фиолетовом, алифатические – на зелёном, S/T – на темно-жёлтом. Высоко консервативные аминокислоты отмечены звездочками под последовательностью, консервативные – двумя точками, часто сохраняющиеся – одной точкой

Dnmt3L и полярные – за счёт водородных связей между остатками R и D в RD-интерфейсе при контакте Dnmt3a с другой молекулой Dnmt3a, когда формируется сайт связывания ДНК (рис. 3) [1]. Оба интерфейса вместе необходимы для правильного связывания кофактора AdoMet и правильного функционирования фермента [29, 30]. Однако отсутствие Dnmt3L в системе не является критичным для Dnmt3a, так как в этом случае МТаз способна образовывать аналогичные активные тетрамеры сама с собой [20, 27].

НАРУШЕНИЯ В МЕТИЛИРОВАНИИ ДНК ПРИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

При развитии онкологических заболеваний происходят различные нарушения, ассоциированные с метилированием ДНК (абберрантное метилирование) и с МТазой DNMT3A (точечные мутации в гене DNMT3A и гиперэкспрессия DNMT3A) [4–7].

Нарушения паттерна метилирования ДНК могут происходить уже на ранних стадиях разви-

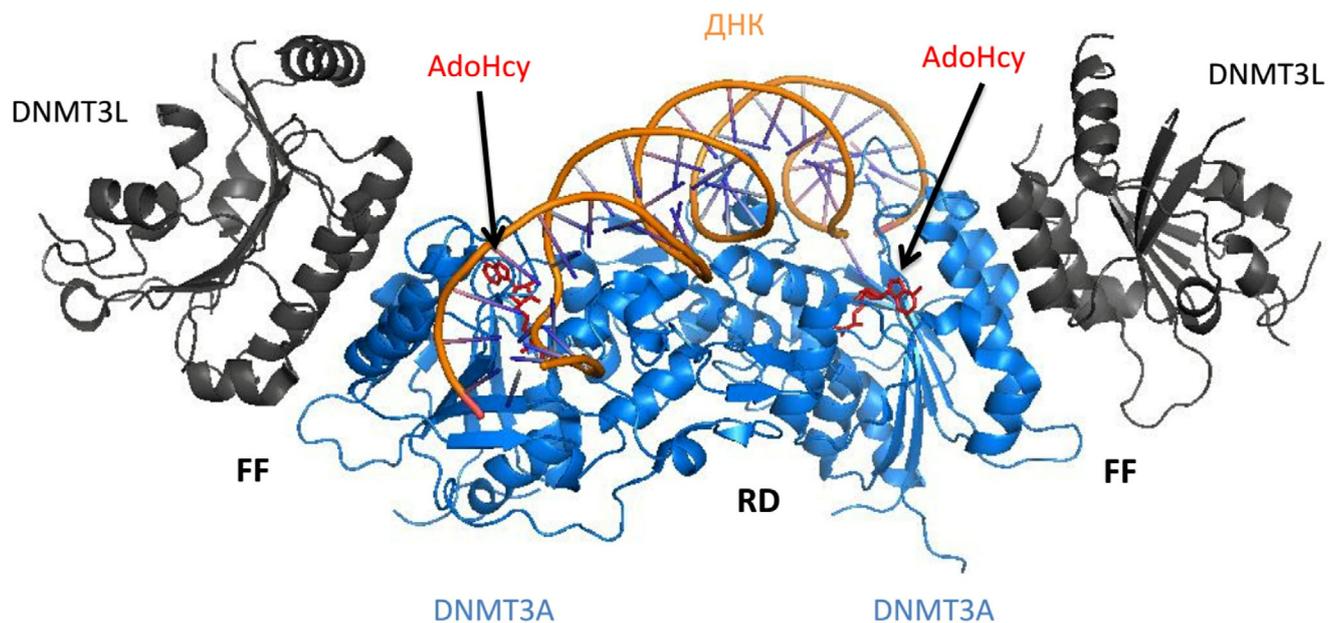


Рис. 3. Структура комплекса DNMT3A–DNMT3L с 25-звенным ДНК-дуплексом, содержащим два CpG-сайта, и с двумя молекулами S-аденозил-L-гомоцистеина (AdoHcy) в активных центрах Dnmt3a (PDB: 5YX2). ДНК и AdoHcy даны в структурном представлении, окрашены оранжевым и красным соответственно; DNMT3A и DNMT3L – в ленточном представлении, окрашены голубым и темно-серым соответственно; отмечены области RD- и FF-интерфейсов

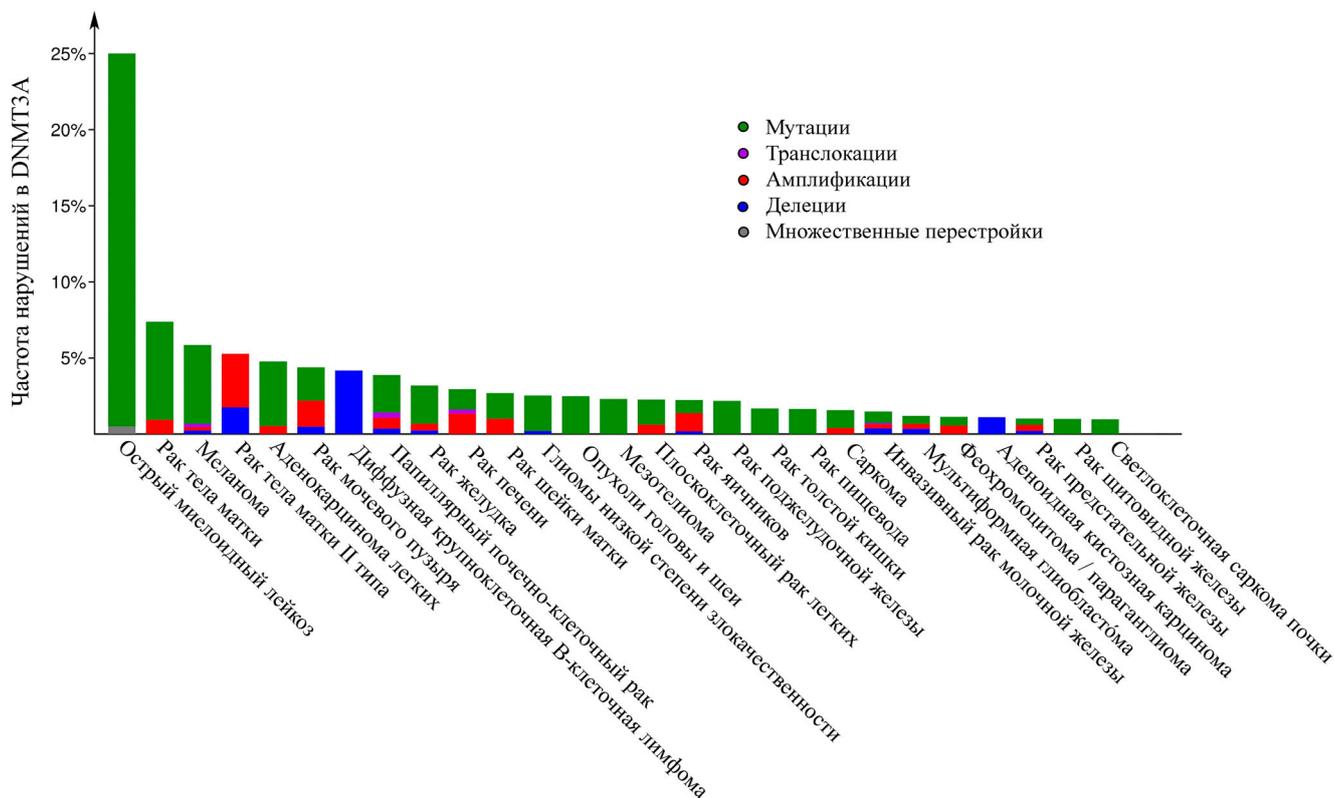


Рис. 4. Частота нарушений в DNMT3A при онкологических заболеваниях различного типа (построено с помощью базы данных CBioPortal [8]). Зеленые столбцы соответствуют точечным мутациям, красные – амплификациям, синие – делециям, фиолетовые – транслокациям, черный – множественным перестройкам. Заболевания с частотой менее 2% не приведены

тия онкологических заболеваний, сопутствуя их прогрессии [5, 6, 31–37]. Для опухолевых клеток характерно обширное гипометилирование повторяющихся и мобильных элементов генома, сопровождающееся локальным гиперметилированием отдельных участков ДНК [5, 38]. Чаще всего наблюдается гиперметилирование промоторных участков генов-супрессоров опухолей и других генетических локусов, важных для запуска внутриклеточных процессов апоптоза, контроля клеточного цикла и обеспечения стабильности генома [5, 6, 38]. Интересно отметить, что locus, который в нормальных клетках частично метилирован, может быть гиперметилирован в одних типах опухолей и гипометилирован – в других [5, 38]. При развитии гематологических заболеваний (и ОМЛ, в частности) большинство опухолевых клеток экспрессируют мутантную форму DNMT3A, и при этом наблюдаются нарушения паттерна метилирования [5, 31, 33–35, 39]. Однако между этими событиями не установлена однозначная причинно-следственная связь. В исследовании больших групп пациентов (более 300 человек) на основании определения паттерна метилирования было выявлено 16 подтипов ОМЛ, а также построен классификатор 15-ти типов нарушений метилирования для предсказания выживаемости пациентов с тем или иным подтипом ОМЛ [33].

Нарушения в гене *DNMT3A* бывают нескольких типов: неправильный сплайсинг, сдвиг рамки считывания и появление мутаций, среди которых последний занимает лидирующую позицию при онкозаболеваниях [6, 8]. Известно, что мутации являются характерными маркерами многих онкологических заболеваний и вносят вклад в трансформацию нормальных клеток [4]. Согласно базе данных CBioPortal, мутации в гене *DNMT3A* присущи многим онкозаболеваниям и составляют 1,8% от всех известных случаев нарушений в ферменте (176 исследований, 44 347 пациентов); из них 77% приходится именно на точечные мутации [8] (рис. 4).

Мутации в *DNMT3A* играют важную роль в патогенезе гематологических заболеваний (ОМЛ, миелодиспластического синдрома (МДС) и миелопролиферативных новообразований) [6]. Полноэкзомное секвенирование выявило наличие точечных мутаций в гене *DNMT3A* и нарушение паттерна метилирования ДНК в 20,5% случаев у пациентов с ОМЛ (более 100 человек) [34]. При изучении обнаруженных мутантных форм *DNMT3A* в культурах клеток для некоторых из них отмечены пониженная активность и нарушенное сродство к гистону H3 [34]. Наблюдалась связь выявленных нарушений с прогрессией онкозаболевания. Эти данные

подтверждаются более поздним исследованием, включавшим 110 онкопациентов и 15 здоровых людей (контрольная группа), в котором выявили точечные мутации в *DNMT3A* у 2,7% пациентов [35]. Было показано, что эти мутации оказывали влияние на уровень экспрессии генов, вовлечённых в развитие ОМЛ. Более подробно точечные мутации будут обсуждаться в следующем разделе.

По данным CBioPortal [8], гиперэкспрессия *DNMT3A* наблюдается в случае многих онкозаболеваний (рис. 5, см. ниже). Гиперэкспрессия *DNMT3A* ассоциирована с плохим прогнозом выживаемости [4, 36, 37, 40–42]. Гиперэкспрессия *MTaz* семейства *DNMT3* вовлечена в регуляцию пролиферации клеток карциномы печени, а также играет ключевую роль в инактивации гена-супрессора опухолей *BRCA1* в клетках рака молочной железы [43, 44]. Кроме того, гиперэкспрессия *DNMT3A* часто сопровождается пониженной экспрессией других ферментов из-за гиперметилирования их промоторов, например факторов *ESR1/PGR* при развитии эндометриоидной карциномы [40]. В таком случае уровень экспрессии *DNMT3A* может являться потенциальным маркером выживаемости пациентов [40]. По последним данным, гиперэкспрессия *DNMT3A* коррелирует с морфологическими нарушениями в опухолевых клетках, а также может быть сопряжена с нарушениями дифференцировки клеток [41].

Биоинформатический анализ данных по экспрессии *DNMT3A* в системе CBioPortal, позволяющий выявить опухоли с гиперэкспрессией фермента на основании расчёта z-фактора по всем имеющимся в системе данным [8], свидетельствует о том, что при ОМЛ по сравнению с другими онкозаболеваниями диапазон увеличения уровня экспрессии *DNMT3A* составляет примерно 4 порядка (рис. 5). Смещение столбца, соответствующего характеристикам опухолевых клеток по уровню экспрессии *DNMT3A* при ОМЛ в правую область гистограммы, позволяет заключить, что гиперэкспрессия *DNMT3A* наиболее ярко выражена именно при ОМЛ. При этом наряду с гиперэкспрессией *DNMT3A* наблюдаются также и мутации в гене *DNMT3A* [5, 37].

Интересно, что гиперэкспрессия *DNMT3A* без мутаций является одной из нескольких причин инициации гиперметилирования ДНК при развитии онкозаболеваний [5]. Гиперметилирование ДНК в сочетании с повышенной активностью *DNMT3A* без мутаций является характерным маркером онкозаболеваний и заболеваний, поражающих сосуды и ткань мозга [5]. К сожалению, подробных исследований послед-

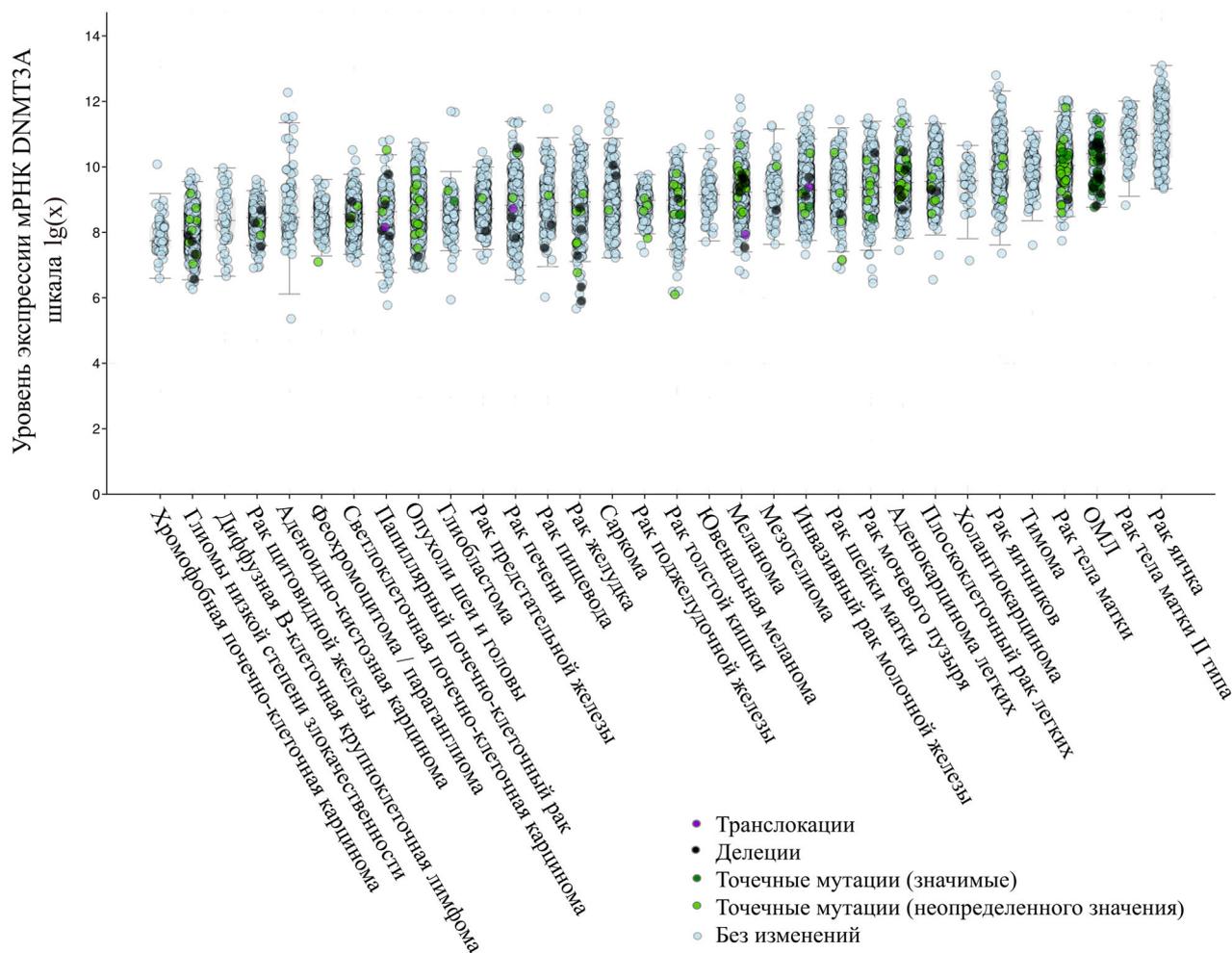


Рис. 5. Экспрессия DNMT3A при различных типах онкологических заболеваний (данные CBioPortal [8]). Ось абсцисс отражает тип онкологического заболевания, ось ординат – уровень мРНК, соответствующей гену *DNMT3A* в клетках онкопациентов. Темно-зелеными и зелеными кружками отмечена экспрессия DNMT3A с точечными мутациями, голубыми – DNMT3A без мутаций, черными – делеции, фиолетовыми – транслокации

ствий гиперэкспрессии мутантных форм DNMT3A не проводилось, но известно, что при развитии ОМЛ гиперэкспрессия мутантной формы DNMT3A2 приводит к повышению пролиферативной активности опухолевых клеток [25].

Мутации в каталитическом домене DNMT3A при ОМЛ. Суммируя данные по DNMT3A, можно выделить две группы мутаций в ферменте, сопутствующих разным типам заболеваний [4, 6]. К первой группе относятся мутации в каталитическом домене МТазы, которые наблюдаются в основном при развитии гематологических заболеваний и ОМЛ, в частности [8, 9, 45]. Вторая группа включает в себя мутации в PWWP- и ADD-доменах N-концевого регуляторного фрагмента, встречающиеся чаще при иных типах онкологических заболеваний [4, 6, 45].

Как видно из распределения на рис. 6, при развитии ОМЛ точечные мутации в PWWP- и ADD-доменах немногочисленны (зеленые точки), чаще образуются делеции (черные точки) [8, 45]. Изучение мутаций в этих доменах представляет интерес с точки зрения их влияния не только на метилирование ДНК и функционирование генов, но и на взаимодействие DNMT3A с гистоновыми белками в клетке. В основном исследованы мутантные формы DNMT3A, найденные у больных с наследственными заболеваниями [45]. В этом случае немногочисленные биохимические данные свидетельствуют о нарушениях взаимодействия таких мутантных форм DNMT3A с хвостами гистонов [33, 45].

Основная же часть мутаций (более 50%) приходится на каталитический домен DNMT3A [4,

6, 8, 37, 45] (рис. 6, зелёные точки), поэтому далее мы сосредоточимся на более подробном их рассмотрении.

Мутация остатка R882. В каталитическом домене DNMT3A можно выделить несколько аминокислотных остатков, замена которых чаще всего происходит при развитии ОМЛ: R882 (58%), R736 (2%), H631 (~1%) и G543 (~1%) [8, 9, 10] (рис. 6). На сегодняшний день наиболее подробно изученной является лишь «горячая точка мутагенеза» – остаток R882 заменяется чаще всего на остаток Н (~40% всех случаев) или С (~11%) [9]. Эта мутация, как и другие в DNMT3A у онкопациентов, является соматической и присутствует в опухолевых клетках в одном аллеле [9].

Структурно-функциональный аспект. В 2014 г. Russler-Germain et al. [13] было установлено, что мутация R882H попадает в область полярного RD-интерфейса, формирующегося за счёт «гомодимерного» взаимодействия DNMT3A–DNMT3A в тетрамере (рис. 3), и нарушает образующиеся там контакты. Таким образом, нарушается способность МТазы образовывать активные тетрамеры, что приводит к 80% потере метилирующей активности фермента [13]. Эти данные коррелируют с исследованиями с использованием Dnmt3a мыши, указывающими, что мутация R878H (соответствует R882H в DNMT3A) приводит к снижению каталитической активности фермента [37]. Кроме того, наличие такой замены влияет на способность фермента связываться с ДНК [37]. Исследования 2018–2020 гг. выявили новый аспект возможного влияния мутации R882H: у ферментов с мутациями изменяются предпочтительные нуклеотидные последовательности, фланкирующие CpG-сайт метилирования [15, 17]. Anteneh et al. [17] продемонстри-

ровали различными методами, включая РСА, что замена R882 на Н приводит к изменениям во взаимной ориентации RD-интерфейса и узнающей петли из TRD-домена относительно друг друга, что, в свою очередь, приводит к нарушению способности DNMT3A–R882H узнавать CpG-сайт в оптимальном нуклеотидном контексте.

Мутация R882 в опухолевых клетках. В 2019 г. было обнаружено, что мутация R882H приводит в клетках к стабилизации протяженных олигомеров DNMT3A со сниженной каталитической активностью, что и может являться одной из механистических причин прогрессии лейкоза [16]. Кроме того, исследования *in vivo* показали, что в опухолевых клетках практически полностью подавлена экспрессия DNMT3B, таким образом, наблюдаемые нарушения паттерна метилирования в миелобластах связаны именно с функционированием DNMT3A [13].

Для R882H была выдвинута гипотеза о существовании связи между характерным для ОМЛ нарушенным паттерном метилирования, не наблюдающимся при других типах онкологических заболеваний, и мутацией R882H в DNMT3A [39]. Было проведено полногеномное бисульфитное секвенирование ДНК клеток-предшественников (бластных опухолевых клеток) и нормальных клеток крови, экспрессирующих DNMT3A дикого типа или с мутацией R882H/С, и определена степень метилирования ДНК в CpG-островках и вне таких островков [39]. Оказалось, что мутация R882H/С в миелобластных клетках приводит к гипометилированию CpG-островков, фактически удаляя их гиперметилирование, которое наблюдается в этих клетках в отсутствие мутации. Мутация R882H/С в здоровых клетках вызывает гипометилирование CpG. Было сделано предпо-

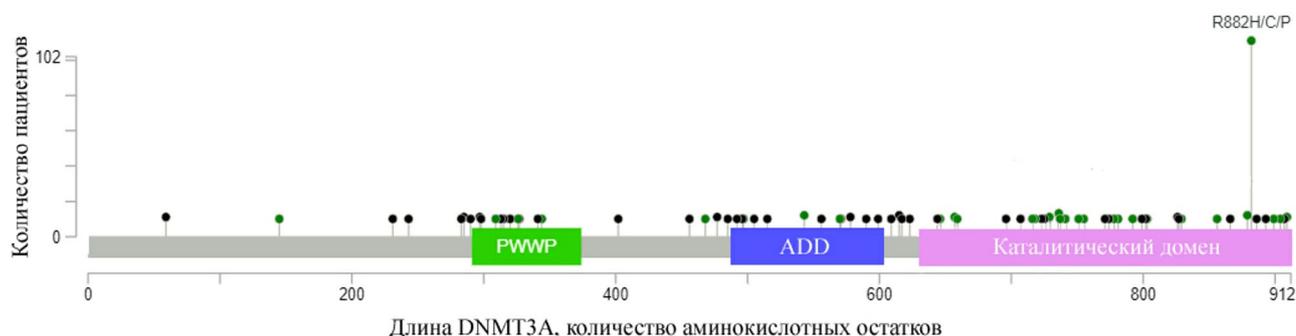


Рис. 6. Схема DNMT3A человека с распределением нарушений, сопутствующих ОМЛ (построено с помощью базы данных SVBioPortal [8], 1278 пациентов в выборке). Темно-зеленым цветом отмечены точечные мутации, черным – укороченные формы, высота каждого столбика отражает количество пациентов с данным нарушением. Указаны три главных домена фермента: PWWP- (292–350 а.о., зеленый цвет), ADD- (482–614 а.о., синий цвет) и каталитический (634–912 а.о., розовый цвет)

ложение, что гиперметилирование может играть роль результата неудачных попыток организма ограничить пролиферацию лейкозных клеток, а наличие мутации R882H/C в DNMT3A приводит к серьёзному нарушению этого процесса, что, в свою очередь, может инициировать процесс трансформации [39]. Это согласуется с исследованием Russler-Germain et al. [13], где было показано, что при ОМЛ наблюдается гиперэкспрессия DNMT3A дикого типа и с мутацией R882H/C, а паттерн метилирования ДНК зависит от того, какой именно фермент присутствует в клетках. Показано, что в лейкозных клетках с DNMT3A дикого типа происходит гиперметилирование ДНК, а с мутацией R88H/C – гипометилирование. При продукции обоих ферментов одновременно наблюдается даже большее снижение активности DNMT3A, чем в случае присутствия одного только R882H/C. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о доминантно-негативной роли мутации R882H в DNMT3A, то есть о том, что в гетерозиготных по DNMT3A клетках с ОМЛ продукция DNMT3A–R882H/C способствует подавлению экспрессии DNMT3A дикого типа. Однако есть данные, опровергающие доминантно-негативную гипотезу. Так, в опытах на клеточных культурах со смешанными тетрамерами DNMT3A–R882H наблюдаемые доминантно-негативные эффекты не обнаруживаются [14]. Более того, активность этих смешанных комплексов оказалась даже чуть выше ожидаемой для них (с учётом декларируемой потери метилирующей активности [13]) и приводила к гиперметилированию. Таким образом, вопрос о доминантно-негативной роли DNMT3A с мутацией R882H в прогрессии ОМЛ остаётся дискуссионным.

Мутации «не-аргининового» типа. Наряду с мутацией R882H/C в каталитическом домене DNMT3A имеются многочисленные мутации, которые встречаются только у 1–5% пациентов с ОМЛ и достаточно разнообразны по своей природе (рис. 6) [4, 9, 12]. На данный момент времени «не-аргининовые» мутации менее подробно изучены с точки зрения их влияния на функционирование DNMT3A, чем R882H/C, и если в случае мутации R882H под нарушение метилирования подведен структурный базис, то для «не-аргининовых» мутаций такая информация отсутствует [10, 17]. Далее приводится анализ посвященных им исследований как с использованием модельных ДНК-субстратов, так и на клеточных линиях.

С точки зрения установления молекулярной основы наблюдаемых эффектов, мутации удобно разбить по группам в соответствии с функци-

онально значимыми областями DNMT3A: а.о., участвующими в связывании с ДНК, интерфейсами RD и FF, а также с консервативными мотивами I–X.

ДНК-связывающие аминокислотные остатки. Эти остатки расположены в каталитической петле DNMT3A (G707–K721) и в петле в TRD (R831–F848) [29]. Некоторые из них (S714, V716, P718, R792, T835, N838, R836 и K841) подвергаются мутациям при ОМЛ [29]. Наиболее подробно изучено влияние мутации остатка S714, расположенного в каталитической петле DNMT3A, на функционирование фермента [29, 46, 47]. Показано снижение метилирующей активности полноразмерной DNMT3A человека с этой мутацией, что согласуется с таким же эффектом в случае соответствующей мутации (S124C) в Dnmt3a-CD мыши [29, 46, 47]. Активность фермента частично восстанавливалась в присутствии регуляторного фактора Dnmt3L [29, 47]. Согласно структуре комплекса DNMT3A с ДНК-дуплексом, остаток S714 образует контакты с углеводофосфатным остовом вблизи цитозина-мишени [29]. Этот факт, а также отсутствие ковалентного интермедиата реакции метилирования при взаимодействии мутантной формы фермента с ДНК позволил Khrabrova et al. [46] сделать предположение, что S714 играет важную роль в выпетливании цитозина-мишени из двойной спирали, а при замене С на S, вероятно, этот процесс нарушается. В случае мутаций V716D, R792H, P718L, N838D, R836W, T835M и K841E было показано значительное снижение метилирующей активности DNMT3A без дальнейшего изучения молекулярного механизма [29].

Интерфейсы RD и FF. В области FF-интерфейса (рис. 3) (контакт DNMT3A с DNMT3L) мутациям подвергаются остатки R736, R729, P904 и R771 [8, 10]. В случае мутаций R736H, R729W и P904L метилирующая активность DNMT3A снижается, а в случае Dnmt3a мыши для мутации R146H (соответствует R736H человека) – полностью отсутствует [46–48]. Добавление в систему регуляторного фактора Dnmt3L увеличивало активность мутантных форм R736H и P904L, но не R729W [47, 48]. Исследуя причины этого явления, Sandoval et al. [47] и Holz-Schietinger et al. [48] установили, что замена R729W приводит к димеризации DNMT3A без дальнейшего присоединения субъединиц DNMT3L, а все остальные замены – к образованию менее активных тетрамеров, чем в случае DNMT3A дикого типа. Таким образом, в случае R729W, R736H и P904L выявлено возможное нарушение важных контактов в области взаимодействия DNMT3A и DNMT3L [47, 48].

Отдельно следует рассмотреть остаток R771, в случае которого выявлены замены на L, P, G или Q [8]. При замене R на L, P и G наблюдается снижение каталитической активности DNMT3A, которая полностью (R771L) или частично (R771P и R771G) восстанавливается при добавлении регуляторного фактора DNMT3L [47, 48]. Эти наблюдения предполагают, что в случае мутации остатка R771 также происходит нарушение контактов в области взаимодействия DNMT3A и DNMT3L, как и в случае остатков R736 и P904 [47, 48]. Интересно, что замена R771Q, наоборот, приводит к повышению активности DNMT3A, которая усиливается в присутствии DNMT3L [47]. На этом примере становится очевидно, что замена аминокислоты в одной и той же позиции на аминокислоты с отличными от исходных свойствами каждый раз даёт различный результат.

Для мутаций R771Q и R736H, расположенных в FF-интерфейсе, а также для мутации W893S, попадающей в область RD-интерфейса (рис. 3), показан удивительный факт: в случае субстратов с большим содержанием CpG и субстратов, не содержащих CpG, отсутствовало различие в метилировании ДНК [47]. В связи с этим Sandoval et al. [47] впервые поднимают вопрос о способности DNMT3A с мутациями к неспецифическому («не-CpG») метилированию ДНК. Подобный эффект, по всей видимости, необходимо проверить для каждой конкретной мутации.

Консервативные мотивы I–X. Следует выделить остатки R635 и F752, мутирующие при ОМЛ [8]. R635 находится в пределах консервативного мотива I (рис. 2), вовлечённого в связывание с AdoMet, и для него характерны замены на W и G [1, 8]. На модельной системе с использованием каталитического домена МТазы Dnmt3a-CD мыши в случае мутации R45W (R635W у человека) показана полная потеря метилирующей активности и способности связываться с ДНК [46]. Для мутации R635G в полно-размерной человеческой DNMT3A наблюдалось снижение активности фермента либо её полная потеря в зависимости от количества CpG-сайтов в протяжённых ДНК-субстратах [47]. Возможно, остаток R635 важен для способности МТазы связывать AdoMet, и мутация R635W нарушает этот процесс [46].

Остаток F752 расположен рядом с важной для катализа ENV-последовательностью мотива VI (рис. 2), и для него характерна замена на V [8]. Показано, что мутация F162V в Dnmt3a-CD мыши (F752V у человека) приводит к полной потере активности фермента, в том числе и в присутствии Dnmt3L, и к ухудшению

связывания с ДНК более чем в 3 раза [46]. Вероятно, замена F на V создаёт стерическое препятствие, которое может повлиять на взаимодействие аминокислот из мотива VI (ENV) с цитозин-мишенью.

Вне консервативных мотивов. В работе Khrabrova et al. [46] на модельной Dnmt3a-CD мыши была исследована мутация P187R (P777R у человека), не попадающая в функционально значимые области МТазы, но представляющая интерес с точки зрения значительных различий в структуре и свойствах заменяемых аминокислот. Показано снижение каталитической активности и ухудшение способности связывания с ДНК этой мутантной формы [46]. Авторы этой работы заключили, что мутация P187R может критическим образом нарушать третичную структуру DNMT3A и приводить к наблюдаемым эффектам.

Следует отметить, что в рассмотренных исследованиях на модельных системах использовали различные ДНК-субстраты: короткие с одним или многими CpG-сайтами или протяжённые, тоже с разным количеством CpG-сайтов [29, 46, 47]. Зачастую получаемые данные для одной и той же мутантной формы варьируют в зависимости от использованного ДНК-субстрата и даже противоречат друг другу. Возможно, именно со строением субстрата связаны наблюдаемые различия в метилирующей активности для мутантных форм R771Q, R736H и P904L [46, 47].

Мутации «не-аргининового» типа в опухолевых клетках. Подобных исследований немного, и их результаты не всегда согласуются с данными, полученными вне клеточных культур [29, 47]. В частности, описанные результаты с использованием модельных ДНК-субстратов хорошо коррелируют с данными, полученными на клеточных линиях для S714C [47], а также R836W, V716D, R792H и K841E [29]. Однако для мутации R771Q подобная корреляция отсутствует, и наблюдаемые эффекты зависят от используемой системы: активность фермента при использовании модельных ДНК-субстратов повышается, а в случае эмбриональных стволовых клеток наблюдается противоположный эффект [47].

Подводя итоги, можно заключить, что практически все точечные мутации «не-аргининового» типа в каталитическом домене DNMT3A, выявленные при ОМЛ, приводят к полной или частичной потере метилирующей активности этой МТазы. Лишь для S714C и R729W установлен молекулярный механизм, лежащий в основе снижения активности фермента. Для других мутантных форм DNMT3A установленного молекулярного механизма нет.

кулярного механизма нет, но прослеживается несколько факторов, определяющих работу МТазы. Для мутаций R771Q/L/P/G/H и R635W/G наблюдается зависимость активности мутантной формы DNMT3A от химической природы заменяемых и заменяющихся аминокислот. Кроме того, мутации R771Q, R736H и W983S демонстрируют нехарактерное для DNMT3A неспецифичное метилирование ДНК. Эффекты очень немногих мутаций (S714C, R771Q, R836W, V716D, R792H и K841E) изучены на клеточных линиях, а полученные данные не всегда совпадают с результатами экспериментов на системах с использованием модельных ДНК-субстратов. Таким образом, очевидно, что для выявления молекулярного механизма, лежащего в основе наблюдаемых при ОМЛ нарушений, исследования следует проводить отдельно для каждой мутации, анализируя эффекты как на уровне изучения отдельных стадий функционирования фермента, так и на уровне экспериментов в опухолевых клетках.

Мутации в каталитическом домене DNMT3A при других гематологических заболеваниях. Мутации в каталитическом домене DNMT3A распространены не только при развитии ОМЛ, но и при других типах гематологических заболеваний [4, 6, 7, 36, 37]. Следует выделить МДС, мутации при котором часто формируют профиль распределения в DNMT3A схожий с наблюдаемым при ОМЛ [8, 32]. При МДС нарушения в DNMT3A наблюдаются у 7% пациентов, а в группе всех типов гематологических заболеваний – у 10% [8, 32]. Более 6% из наблюдаемых при МДС нарушений в DNMT3A – точечные мутации [32]. При МДС точно так же, как и при ОМЛ, самой распространенной мутацией является R882 [32]. Есть исследования, указывающие, что клетки с такими мутациями в DNMT3A имеют большую вероятность опухолевой трансформации по сравнению с нормальными [49].

Еще одним заболеванием, при котором часто наблюдаются мутации, совпадающие с мутациями при ОМЛ, является острый лейкоз смешанного типа (ОЛСТ) [50]. Для ОЛСТ характерно развитие фенотипических признаков сразу двух других типов заболеваний – В-клеточного и Т-клеточного лимфоидных лейкозов; они составляют 5% от всех типов лейкозов [50]. При этом у трети пациентов с ОЛСТ мутируют эпигенетические модификаторы с превалированием мутаций в DNMT3A [8, 50]. Как в случае ОМЛ и МДС, при данной форме заболевания чаще всего наблюдаются мутации остатка R882, а мутации в гене DNMT3A происходят уже в клетках-предшественниках [8, 32, 50–52]. Как и в случае МДС, при ОЛСТ в этих клетках точеч-

ные мутации в DNMT3A возникают раньше последующих изменений, а также, по данным некоторых исследований, предшествуют дальнейшей трансформации клеток [32, 50–52]. Таким образом, мутации в DNMT3A могут быть рассмотрены в качестве потенциального маркера для диагностики ОЛСТ и МДС.

Ингибиторы МТаз и терапия ОМЛ при наличии мутаций в DNMT3A. Как обсуждалось выше, в случае злокачественных новообразований наблюдается гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста, что приводит к их инактивации. Нуклеозидные ингибиторы МТаз: 5-азациитидин (видаза) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин), а также 2'-деокси-5-азациитидил-(3'→5')-2'-дезоксигуанозин (гвадеситабин) очень давно широко используются как эффективные химиотерапевтические средства при злокачественных заболеваниях крови (в частности, одобрены для ОМЛ и МДС) [53–56]. Они включаются в ДНК в процессе её синтеза, что приводит к замене цитозина-мишени на 5-азацитозин и блокированию МТазы за счет её необратимого связывания с ДНК. Эти деметилирующие агенты вызывают реэкспрессию молчащих генов (активируются гены-супрессоры опухолей). Применение классической гипометилирующей терапии кажется проблематичным в случае пациентов с мутациями в DNMT3A, при наличии которых, как показано выше, в большинстве случаев также снижается метилирующая активность этого фермента. Однако, по некоторым данным, применение деметилирующих препаратов было успешным и даже способствовало быстрой ремиссии у пациентов с миелодиспластическим синдромом [37, 57, 58]. Очевидно, что ответ на этот вопрос требует проведения масштабных клинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения в метилировании ДНК были выявлены при различных онкозаболеваниях. В последнее время был опубликован ряд исследований, демонстрирующих, что для злокачественных новообразований системы крови характерны точечные мутации в гене МТазы DNMT3A. При этом мутации локализованы в основном в каталитическом домене DNMT3A. Отдельные виды онкозаболеваний системы крови имеют характерные распределения мутаций, но некоторые мутации могут быть характерными для разных заболеваний этой группы. Это позволяет предположить, что, возможно, при развитии онкозаболеваний системы крови су-

существует некая общность последствий в нарушениях процесса метилирования, ассоциированных с мутациями в гене *DNMT3A*. Наиболее часто мутации в *DNMT3A* наблюдаются при развитии ОМЛ, и проведенные на сегодняшний день исследования позволяют однозначно утверждать, что они приводят к нарушению функционирования МТазы DNMT3A. В случае мутации R882H, известной в качестве «горячей точки мутагенеза», вскрыт ее многосторонний эффект: ухудшение каталитической активности DNMT3A, нарушение специфичности взаимодействия с CpG-сайтом и фланкирующими его нуклеотидными последовательностями [17]. Важно, что и «не-аргининовые» мутации, несмотря на их малую распространенность, вносят значительный вклад в наблюдаемые нарушения в работе DNMT3A, даже когда они не затрагивают функциональные центры этой МТазы [4, 45–48]. Однако выявить молекулярный механизм, лежащий в основе наблюдаемых явлений,

удается лишь в отдельных случаях. Понимание молекулярных механизмов, ведущих к проявлению описанных эффектов, будет способствовать разработке новых подходов к лечению ОМЛ с мутациями в гене *DNMT3A* и таким образом совершенствованию персонализированной терапии гематологических онкозаболеваний, а также созданию новых методов ранней диагностики и мониторинга ОМЛ.

Финансирование. Написание данного обзора стало возможным благодаря финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00533-а).

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

- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., and Jeltsch, A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases, *Chembiochem.*, **12**, 206-222, doi: 10.1002/cbic.201000195.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, **16**, 6-21, doi: 10.1101/gad.947102.
- Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 484-492, doi: 10.1038/nrg3230.
- Zhang, W., and Xu, J. (2017) DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis, *Biomarker Res.*, **5**, 1-7, doi: 10.1186/s40364-017-0081-z.
- Ehrlich, M. (2019) DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance, *Epigenetics*, **14**, 1141-1163, doi: 10.1080/15592294.2019.1638701.
- Hamidi, T., Singh, A. K., and Chen, T. (2015) Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases, *Epigenomics*, **7**, 247-265, doi: 10.2217/epi.14.80.
- Robertson, K. D. (2005) DNA methylation and human disease, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 597-610, doi: 10.1038/nrg1655.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., et al. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data, *Cancer Discov.*, **2**, 401-404, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11112-05.
- O'Brien, E. C., Brewin, J., and Chevassut, T. (2014) DNMT3A: the DioNysian MonsTer of acute myeloid leukaemia, *Ther. Adv. Hematol.*, **5**, 187-196, doi: 10.1177/2040620714554538.
- Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., et al. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **363**, 2424-2433, doi: 10.1056/NEJMoa1005143.
- Sun, Y., Shen, H., Xu, T., Yang, Z., Qiu, H., et al. (2016) Persistent DNMT3A mutation burden in DNMT3A mutated adult cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients in long-term remission, *Leuk. Res.*, **49**, 102-107, doi: 10.1016/j.leukres.2016.09.001.
- Hou, H. A., Kuo, Y. Y., Liu, C. Y., Chou, W. C., Lee, M. C., et al. (2012) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications, *Blood*, **119**, 559-568, doi: 10.1182/blood-2011-07-369934.
- Russler-Germain, D. A., Spencer, D. H., Young, M. A., Lamprecht, T. L., Miller, C. A., et al. (2014) The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers, *Cancer Cell*, **25**, 442-454, doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.010.
- Emperle, M., Dukatz, M., Kunert, S., Holzer, K., Rajavelu, A., et al. (2018) The DNMT3A R882H mutation does not cause dominant negative effects in purified mixed DNMT3A/R882H complexes, *Sci. Rep.*, **8**, 13242-13251, doi: 10.1038/s41598-018-31635-8.
- Emperle, M., Rajavelu, A., Kunert, S., Arimondo, P. B., Reinhardt, R., et al. (2018) The DNMT3A R882H mutant displays altered flanking sequence preferences, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3130-3139, doi: 10.1093/nar/gky168.
- Nguyen, T. V., Yao, S., Wang, Y., Rolfé, A., Selvaraj, A., et al. (2019) The R882H DNMT3A hotspot mutation stabilizes the formation of large DNMT3A oligomers with low DNA methyltransferase activity, *J. Biol. Chem.*, **294**, 16966-16977, doi: 10.1074/jbc.RA119.010126.
- Anteneh, H., Fang, J., and Song, J. (2020) Structural basis for impairment of DNA methylation by the DNMT3A R882H mutation, *Nat. Commun.*, **11**, 2294-2306, doi: 10.1038/s41467-020-16213-9.
- Chen, T., and Li, E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **60**, 55-89, doi: 10.1016/S0070-2153(04)60003-2.
- Cheng, X., and Blumenthal, R. M. (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective, *Structure*, **16**, 341-350, doi: 10.1016/j.str.2008.01.004.
- Chédin, F. (2011) The DNMT3 family of mammalian *de novo* DNA methyltransferases, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **101**, 255-285, doi: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00007-X.

21. Gowher, H., and Jeltsch, A. (2018) Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1191-1202, doi: 10.1042/BST20170574.
22. Ravichandran, M., Jurkowska, R. Z., and Jurkowski, T. P. (2018) Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery, *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 1419-1435, doi: 10.1039/c7ob02574b.
23. Posfai, J., Bhagwat, A. S., Posfai, G., and Roberts, R. J. (1989) Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2421-2435, doi: 10.1093/nar/17.7.2421.
24. Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., and Jeltsch, A. (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosineC5)-methyltransferases by Dnmt3L, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13341-13348, doi: 10.1074/jbc.M413412200.
25. Lin, N., Fu, W., Zhao, Ch., Li, B., Yan, X., and Li, Y. (2017) Biologico-clinical significance of DNMT3A variants expression in acute myeloid leukemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **494**, 270-277, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.041.
26. Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., and Cheng, X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix, *Cell*, **76**, 357-369, doi: 10.1016/0092-8674(94)90342-5.
27. Gromova, E. S., and Khoroshaev, A. V. (2003) Prokaryotic DNA methyltransferases: structure and mechanism of interaction with DNA, *Mol. Biol.*, **37**, 260-272, doi: 10.1023/A:1023301923025.
28. Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A., and Cheng, X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for *de novo* DNA methylation, *Nature*, **449**, 248-251, doi: 10.1038/nature06146.
29. Zhang, Z. M., Lu, R., Wang, P., Yu, Y., Chen, D., et al. (2018) Structural basis for DNMT3A-mediated *de novo* DNA methylation, *Nature*, **554**, 387-391, doi: 10.1038/nature25477.
30. Holz-Schietinger, C., Matje, D. M., Harrison, M. F., and Reich, N. O. (2011) Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of *de novo* DNA methylation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 41479-41488, doi: 10.1074/jbc.M111.284687.
31. Gros, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Erdmann, A., et al. (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches, *Biochimie*, **94**, 2280-2296, doi: 10.1016/j.biochi.2012.07.025.
32. Heuser, M., Yun, H., and Thol, F. (2017) Epigenetics in myelodysplastic syndromes, *Semin. Cancer Biol.*, **51**, 170-179, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.07.009.
33. Figueroa, M. E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., et al. (2010) DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **17**, 13-27, doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.020.
34. Yan, X. J., Xu, J., Gu, Z. H., Pan, C. M., Lu, G., et al. (2011) Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia, *Nat. Genet.*, **43**, 309-315, doi: 10.1038/ng.788.
35. Ponciano-Gómez, A., Martínez-Tovar, A., Vela-Ojeda, J., Olarte-Carrillo, I., Centeno-Cruz, F., and Garrido, E. (2017) Mutations in TET2 and DNMT3A genes are associated with changes in global and gene-specific methylation in acute myeloid leukemia, *Tumour Biol.*, **39**, 1-12, doi: 10.1177/1010428317732181.
36. Jin, B., and Robertson, K. D. (2013) DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer, in *Epigenetic Alterations in Oncogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Karpf, A., eds.) Vol. 754, Springer, New York, NY, doi: 10.1007/978-1-4419-9967-2_1.
37. Yang, L., Rau, R., and Goodell, M. A. (2015) DNMT3A in haematological malignancies, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 152-165, doi: 10.1038/nrc3895.
38. Belle, R., Kawamura, A., and Arimondo, P. (2019) Chemical compounds targeting DNA methylation and hydroxymethylation, in *Chemical epigenetics*, Springer Nature, Cham, pp. 255-286.
39. Spencer, D. H., Russler-Germain, D. A., Ketkar, S., Helton, N. M., Lamprecht, T. L., et al. (2017) CpG island hypermethylation mediated by DNMT3A is a consequence of AML progression, *Cell*, **168**, 1-16, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.021.
40. He, D., Wang, X., Zhang, Y., Zhao, J., Han, R., and Dong, Y. (2019) DNMT3A/3B overexpression might be correlated with poor patient survival, hypermethylation and low expression of ESR1/PGR in endometrioid carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas, *Chin. Med. J. (Engl.)*, **132**, 161-170, doi: 10.1097/CM9.0000000000000054.
41. Kataoka, I., Funata, S., Nagahama, K., Isogaya, K., Takeuchi, H., et al. (2020) DNMT3A overexpression is associated with aggressive behavior and enteroblastic differentiation of gastric adenocarcinoma, *Ann. Diagn. Pathol.*, **44**, 151456-151462, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2019.151456.
42. Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1148-1159, doi: 10.1056/NEJMra072067.
43. Zhao, Z., Wu, Q., Cheng, J., Qiu, X., Zhang, J., and Fan, H. (2010) Depletion of DNMT3A suppressed cell proliferation and restored PTEN in hepatocellular carcinoma cell, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 1-10, doi: 10.1155/2010/737535.
44. Butcher, D. T., and Rodenhiser, D. I. (2007) Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours, *Eur. J. Cancer*, **43**, 210-219, doi: 10.1016/j.ejca.2006.09.002.
45. Norvil, A. B., Saha, D., Dar, M. S., and Gowher, H. (2019) Effect of disease-associated germline mutations on structure function relationship of DNA methyltransferases, *Genes*, **10**, 369-385, doi: 10.3390/genes10050369.
46. Khrabrova, D. A., Loiko, A. G., Tolkacheva, A. A., Cherepanova, N. A., Zvereva, M. I., et al. (2020) Functional analysis of DNMT3A DNA methyltransferase mutations reported in patients with acute myeloid leukemia, *Biomolecules*, **10**, 8-25, doi: 10.3390/biom10010008.
47. Sandoval, J. E., Huang, Y. H., Muike, A., Goodell, M. A., and Reich, N. O. (2019) Mutations in the DNMT3A DNA methyltransferase in AML patients cause both loss and gain of function and differential regulation by protein partners, *J. Biol. Chem.*, **294**, 4898-4910, doi: 10.1074/jbc.RA118.006795.
48. Holz-Schietinger, C., Doug, M., Matje, S., and Reich, N. O. (2012) Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation, *J. Bio. Chem.*, **287**, 30941-30951, doi: 10.1074/jbc.M112.366625.
49. Mayle, A., Yang, L., Rodriguez, B., Zhou, T., Chang, E., et al. (2015) Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation, *Blood*, **125**, 629-638, doi: 10.1182/blood-2014-08-594648.
50. Eckstein, O. S., Wang, L., Punia, J. N., Kornblau, S. M., Andreeff, M., et al. (2016) Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) exhibits frequent mutations in DNMT3A and activated signaling genes, *Exp. Hematol.*, **44**, 740-744, doi: 10.1016/j.exphem.2016.05.003.
51. Cole, C. B., Verdoni, A. M., Ketkar, S., Leight, E. R., Russler-Germain, D. A., et al. (2016) PML-RARA requires DNA methyltransferase 3A to initiate acute promyelocytic leukemia, *J. Clin. Invest.*, **126**, 85-98, doi: 10.1172/JCI82897.
52. Cole, C. B., Russler-Germain, D. A., Ketkar, S., Verdoni, A. M., Smith, A. M., et al. (2017) Haploinsufficiency for

- DNA methyltransferase 3A predisposes hematopoietic cells to myeloid malignancies, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3657-3674, doi: 10.1172/JCI93041.
53. Brunetti, L., Gundry, M. C., and Goodell, M. A. (2017) DNMT3A in leukemia, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **7**, 1-18, doi: 10.1101/cshperspect.a030320.
54. Kirsanova, O. V., Cherepanova, N. A., and Gromova, E. S. (2009) Inhibition of C5-cytosine-DNA-methyltransferases, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1175-1186, doi: 10.1134/s0006297909110017.
55. Yu, J., Xie, T., Wang, Z., Wang, X., Zeng, S., Kang, Y., and Hou, T. (2019) DNA methyltransferases: emerging targets for the discovery of inhibitors as potent anticancer drugs, *Drug Discov. Today*, **24**, 2323-2331, doi: 10.1016/j.drudis.2019.08.006.
56. Daher-Reyes, G. S., Merchan, B. M., and Yee, K. (2019) Guadecitabine (SGI-110): an investigational drug for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia, *Expert Opin. Investing. Drugs*, **28**, 835-849, doi: 10.1080/13543784.2019.1667331.
57. Traina, F., Visconte, V., Elson, P., Tabarroki, A., Jankowska, A. M., et al. (2014) Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms, *Leukemia*, **28**, 78-87, doi: 10.1038/leu.2013.269.
58. Klco, J. M., Spencer, D. H., Lamprecht, T. L., Sarkaria, S. M., Wylie, T., et al. (2013) Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cell, *Blood*, **121**, 1633-1643, doi: 10.1182/blood-2012-09-459313.

AML-ASSOCIATED MUTATIONS IN DNMT3A DNA METHYLTRANSFERASE

Review

D. A. Khrabrova^{1*}, M. G. Yakubovskaya², and E. S. Gromova¹

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: khrabrova_da@mail.ru

² Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia

In mammals, DNA methylation is an essential epigenetic modification necessary to maintain genome stability, to regulate gene expression, and for other processes. Many changes have been identified both in the DNA methylation pattern and in the DNA methyltransferase (DNMT) genes during carcinogenesis that are often associated with poor patient prognosis. Human DNMT3A is responsible for *de novo* DNA methylation and it is one of the enzymes in which missense mutations occur most frequently during the early stages of tumor development. DNMT3A mutations are often observed in hematological malignancies especially in acute myeloid leukemia (AML) with a large prevalence of the R882H mutation. This mutation is the only one that has been widely studied both using model DNA substrates and cancer cell lines. Biochemical characterization of other DNMT3A mutants is necessary to assess potential effects of the observed mutations on the functioning of DNMT3A. In this review we consider the currently known DNMT3A mutation observed during AML progression providing a more detailed analysis of the missense mutations in the catalytic domain of the DNMT3A. The effects of R882H and of less common missense mutations on DNMT3A functioning with model DNA substrates and in the cancer cell lines are presented with emphasis on underlying molecular mechanisms. Understanding general features of these mechanisms would be useful for further development of both early diagnostics approaches of hematologic diseases and personalized cancer therapy.

Keywords: DNA methyltransferase Dnmt3a, DNA methylation, mutations, acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, hematological malignancies

УДК 577.2

МИКРОБНЫЙ АРСЕНАЛ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ. ГЛАВА I

Обзор

© 2021 А.Б. Исаев^{1*}, О.С. Мушарова^{1,2}, К.В. Северинов^{1,3*}

¹ Сколковский институт науки и технологий, 143028 Москва, Россия; электронная почта: tcft18@gmail.com

² Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; E-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Поступила в редакцию 10.08.2020

После доработки 18.08.2020

Принята к публикации 12.09.2020

Бактериофаги или фаги представляют собой вирусы, которые инфицируют бактериальные клетки (в рамках этого обзора мы также рассмотрим вирусы, которые инфицируют архей). Постоянная угроза заражения фагами является одной из основных движущих сил эволюции бактериальных геномов. Чтобы противостоять инфекции, бактерии выработали многочисленные защитные стратегии, позволяющие избежать распознавания фагами или прямо препятствующии размножению фагов внутри клетки. Исследования бактериофагов и бактериальных систем защиты были исторически тесно переплетены с развитием методов классической молекулярной биологии и геномной инженерии. В настоящее время благодаря распространению фаговой терапии, широкому применению технологий CRISPR-Cas и развитию биоинформатических подходов, которые облегчают задачу обнаружения новых систем, исследования в области биологии фагов переживают возрождение. В настоящем обзоре описываются различные стратегии, используемые микробами для того, чтобы противостоять фаговой инфекции. Особое внимание уделено новым защитным системам, открытым в последние годы. Первая глава обзора посвящена защите связанной с поверхностью клетки, роли малых молекул, а также системам врожденного иммунитета, зависящим от модификации ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, взаимодействия бактериофагов с клетками-хозяевами, антивирусная защита, иммунные системы, CRISPR-Cas, рестрикция-модификация, BREX, DISARM, фосфоротиоат, системы Dnd.

DOI: 10.31857/S0320972521030076

ВВЕДЕНИЕ

Фаги встречаются в любой природной среде и считаются самыми распространенными биологическими существами на Земле [1–3]. Расчетное количество фаговых частиц может достигать примерно 10^{10} /литр в морской или пресной воде и 10^9 /грамм – в почве. Считается, что количество фагов превышает количество их микробных хозяев в 10 или более раз [4, 5]. Фаги играют важную экологическую роль, контролируя размер и разнообразие микробных популяций [6], а

индуцируемый фагами лизис клеток обеспечивает поступление питательных веществ в пищевые цепи [7]. Фаги значительно ускоряют латеральный перенос генов, и медицински значимые бактериальные признаки часто ассоциируются с профагами [8]. Гены клетки-хозяина могут быть включены в вирусный геном или упакованы в вирусный капсид при генерации транслицирующих частиц [9]. Кроме того, бактерии могут продуцировать фагоподобные частицы (Gene Transferring Agents), несущие ДНК хозяина [10]. Распространение плазмид также

Принятые сокращения: МТазa – метилтрансфераза (MTase); ЭР – эндонуклеаза рестрикции, рестриктаза (REase, Restriction Endonuclease); BREX – система исключения бактериофагов (Bacteriophage Exclusion); CRISPR-Cas – кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки (Clustered Regularly Interspaced Repeats and CRISPR-associated proteins); DISARM – система защитных островков, ассоциированная с рестрикцией-модификацией (Defence Island System Associated with Restriction-Modification); Dnd – фенотип, ассоциированный с деградацией ДНК (DNA Degradation phenotype); DPD – 7-дезазапурин в ДНК; ECM – внеклеточный матрикс (Extracellular Matrix); LPS – липополисахарид; OMV – везикула на основе внешней мембраны (Outer Membrane Vesicle); Pgl – система ограничения роста бактериофагов (Phage Growth Limitation); PLD – фосфолипаза D; PT – фосфоротиоат (phosphorothioate); pVip – прокариотический белок вайперин (prokaryotic Viperin); QS – определение кворума (Quorum Sensing); RBP – рецептор-связывающий белок (Receptor Binding Protein); R-M – рестрикция-модификация (Restriction-Modification); SAM – S-аденозилметионин (S-Adenosyl Methionine); Sie – исключение суперинфекции (Superinfection Exclusion); TA – токсин-антитоксин; TRD – домен, распознающий мишень (Target Recognition Domain).

* Адресат для корреспонденции.

облегчается при фаг-индуцированном лизисе клеток [11].

Теоретические выкладки и математические модели предполагают, что в любой системе репликаторов неизбежно возникают паразитические или эгоистичные элементы, поэтому для достижения их стабильного сосуществования необходимы стратегии противодействия [12–14]. Таким образом, наличие фагов и защитных систем клеток-хозяев можно рассматривать как фундаментальное свойство прокариотических клеток. Миллиарды лет совместной эволюции привели к развитию широкого круга стратегий нападения и защиты, используемых вирусами и их хозяевами. Гены, ассоциированные с защитой клеток от фагов, могут составлять до ~10% генома бактерии [15]. Традиционно, открытие систем защиты клеток от фагов было связано с отбором устойчивых к действию фага штаммов и описанием их специфических свойств. Недавнее увеличение доступности геномных данных и применение биоинформатических подходов значительно расширили эту область науки и позволили провести систематическое предсказание новых кластеров генов защиты от фагов. Популярный подход «вины по ассоциации» (guilt by association) основывается на факте, что функционально связанные гены часто совместно локализованы в геноме [16]. Используя ген с известной функцией в качестве «приманки», можно оценить вероятность обнаружения соседних генов вблизи от «приманки» в различных геномах и предсказать их возможные функциональные связи [17]. Применение этого подхода к известным системам защиты от фагов позволило ввести важное понятие защитных островков — геномных локусов, содержащих кластеры генов противовирусной защиты [18]. Отдельный геном может содержать несколько защитных островков. Часто они ассоциированы с мобильными генетическими элементами, которые вносят важный вклад в горизонтальный перенос генов защитных систем [19, 20]. Поскольку ~2/3 генов, обнаруженных в защитных островках, не были связаны с известными системами защиты, было предсказано существование множества новых типов противовирусных систем [18]. Недавно в результате проведения систематического анализа встречаемости всех rfam белковых доменов в островках защиты в микробном пангеноме были предсказаны примерно 300 семейств генов, которые преимущественно встречаются в ассоциации с известными защитными генами. Среди них гены, которые имели тенденцию образовывать консервативные кластеры, были предположены в качестве кандидатных защитных систем, и не-

которые такие кластеры были исследованы экспериментально. Это привело к валидации десятка новых типов противовирусных систем [21, 22]. Несмотря на то что в последние годы наше понимание обилия типов защитных систем значительно расширилось, можно ожидать, что была раскрыта всего лишь небольшая часть их реального разнообразия, поскольку подавляющая часть геномных данных рассматривается как «темная материя», а защитные островки, состоящие исключительно из генов с неизвестной функцией, не обнаруживаются с помощью современных методов [23]. Дальнейшее совершенствование алгоритмов, использование более точной классификации белковых доменов или применение методов глубокого обучения, уже доказавших свою полезность в прогнозировании функций генов [24–26], должно способствовать дальнейшему продвижению в этой области. В то же время обнаружение новых систем сопряжено с задачей характеристики их биохимических функций, и в настоящее время механизмы противовирусной защиты для большинства новых систем остаются невыясненными.

Общая схема защитных стратегий, действующих на различных стадиях жизненного цикла вируса, представлена на рис. 1. Устойчивость микроорганизмов к действию фагов может быть связана с активностью специфических иммунных систем, основной функцией которых является ингибирование размножения чужеродного генетического материала, или с мутациями и фазовыми вариациями в генах хозяина, которые необходимы для продуктивной вирусной инфекции. Устойчивость к действию фагов также может быть связана с малыми молекулами [27] или с активностью мобильных генетических элементов, препятствующих вирусной инфекции (таких как индуцированные фагами хромосомные островки (PICI, phage-inducible chromosomal islands) и индуцированные фагами элементы подобные хромосомным островкам (PLE, phage-inducible chromosomal island-like element)), которые в некотором смысле можно рассматривать как паразиты паразитов [28, 29]. Иммунные системы часто полагаются на распознавание специфических сайтов в чужеродной нуклеиновой кислоте или иным образом чувствуют фаговую инфекцию, чтобы инициировать ингибирующий ответ. Чтобы избежать токсического воздействия, связанного с несвоевременной активацией, используются различные механизмы дискриминации собственных и чужеродных молекул. Защитные системы можно подразделить на врожденный иммунитет (включая различные типы рестрикции-модифи-

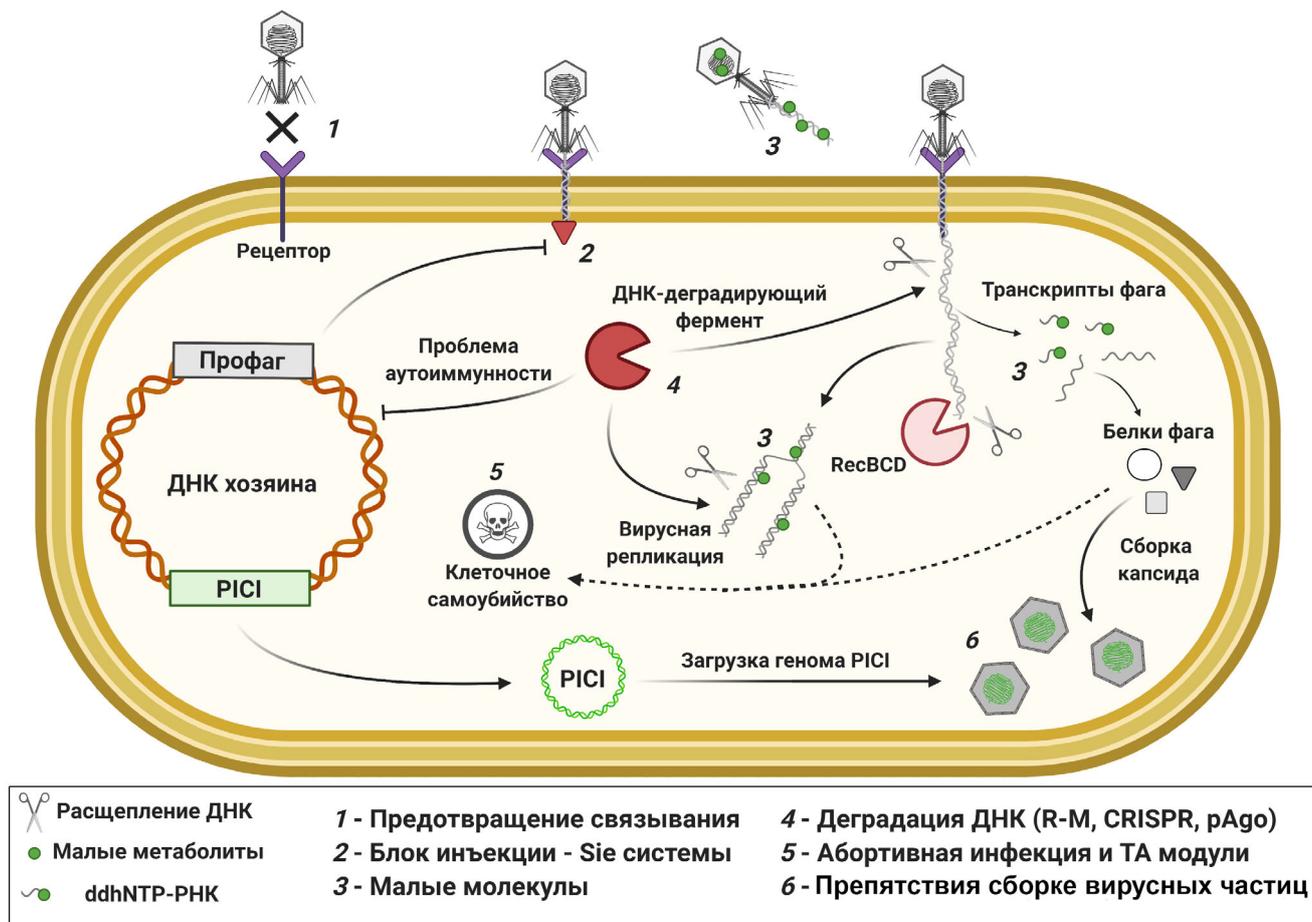


Рис. 1. Общая схема стратегий противовирусной защиты бактерий, действующих на различных стадиях жизненного цикла вирусов. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

кации (R-M), систему исключения бактериофагов (BREX), систему защитных островков, ассоциированных с рестриктией-модификацией (DISARM), токсин-антитоксин (ТА), abortивную инфекцию (Abi) и множество менее изученных систем) и CRISPR-Cas-опосредованный адаптивный иммунитет (кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки). Онлайн базы данных, посвященные прокариотическим иммунным системам, включают REBASE – собрание известных систем R-M [30], TASmania, специализирующаяся на системах ТА [31], CRISPRminer и CRISPRCasdb для систем CRISPR-Cas [32, 33] и PADS, содержащую аннотации генов, ассоциированных с различными типами защиты [34]. Таксономическое распределение белковых доменов, связанных с противовирусной защитой, также можно посмотреть в AnnoTree [35].

Поскольку геномы фагов кодируют лишь ограниченное число генов, они в большинстве

случаев используют аппарат бактериальной клетки для собственной транскрипции и трансляции [36] и часто полагаются на белки клетки-хозяина в качестве кофакторов, как в случае тиоредоксина, который необходим для активности ДНК-полимеразы фага T7 [37]. Во многих исследованиях была показана важность генов клетки-хозяина для эффективной вирусной инфекции, включая работы с KEIO-коллекцией нокаутов отдельных генов *Escherichia coli*, специфическим ингибированием конкретных генов при помощи dCas9 или мутагенеза путем вставки транспозонов [38–44]. Мутации в несущественных генах, необходимых для размножения фагов, являются широко распространенным способом приобретения устойчивости, впервые описанным в классических экспериментах Luria и Delbruck [45].

Практически для каждой известной стратегии микробной защиты фаги выработали средства преодоления, и описание кодируемых фа-

гами ингибиторов новых защитных систем остается лишь вопросом времени [25, 26, 46]. Было высказано предположение, что, подобно защитным островкам, анти-рестрикторные гены имеют тенденцию образовывать кластеры в геномах фагов или в мобильных генетических элементах. Существование таких островков «противо-защиты» должно способствовать открытию новых ингибиторов защиты хозяина [47]. Описание вирусных стратегий противодействия бактериальной защите выходит за рамки настоящего текста, и с этой темой можно ознакомиться в других обзорах [48–50].

Первая глава настоящего обзора будет посвящена микробным стратегиям, позволяющим избежать распознавания фагами, механизмам врожденного иммунитета, блокирующим ранние стадии инфекции, и системам, которые полагаются на модификацию ДНК с целью дискриминации собственного и чужеродного геномов. Вторая глава будет посвящена адаптивным системам иммунитета и защитным механизмам, активирующимся на поздних стадиях инфекции.

ПРОСТЕЙШИЙ ПУТЬ ЗАЩИТЫ – ОСТАТЬСЯ НЕЗАМЕЧЕННЫМ

Фаговая инфекция инициируется при распознавании специфических рецепторов на поверхности клетки фаговым рецептор-связывающим белком (RBP). В качестве рецепторов бактериофагов могут выступать различные типы молекул, которые располагаются на поверхности клеток, в том числе пили и жгутики, белки, липополисахариды (LPS) или углеводы. Взаимодействие между RBP фага и рецептором клетки-хозяина может рассматриваться как лимитирующая стадия инфекционного процесса, по крайней мере, с точки зрения определения спектра подходящих для инфицирования клеток-хозяев [51–53]. Для того, чтобы остаться незамеченными для фагов, прокариоты используют маскировку рецепторов, их модификации и мутации или продуцируют везикулы-ловушки (рис. 2).

Роль внеклеточного матрикса (ECM) и везикул внешней мембраны (OMV). Многие бактерии способны выделять высокомолекулярные поли-

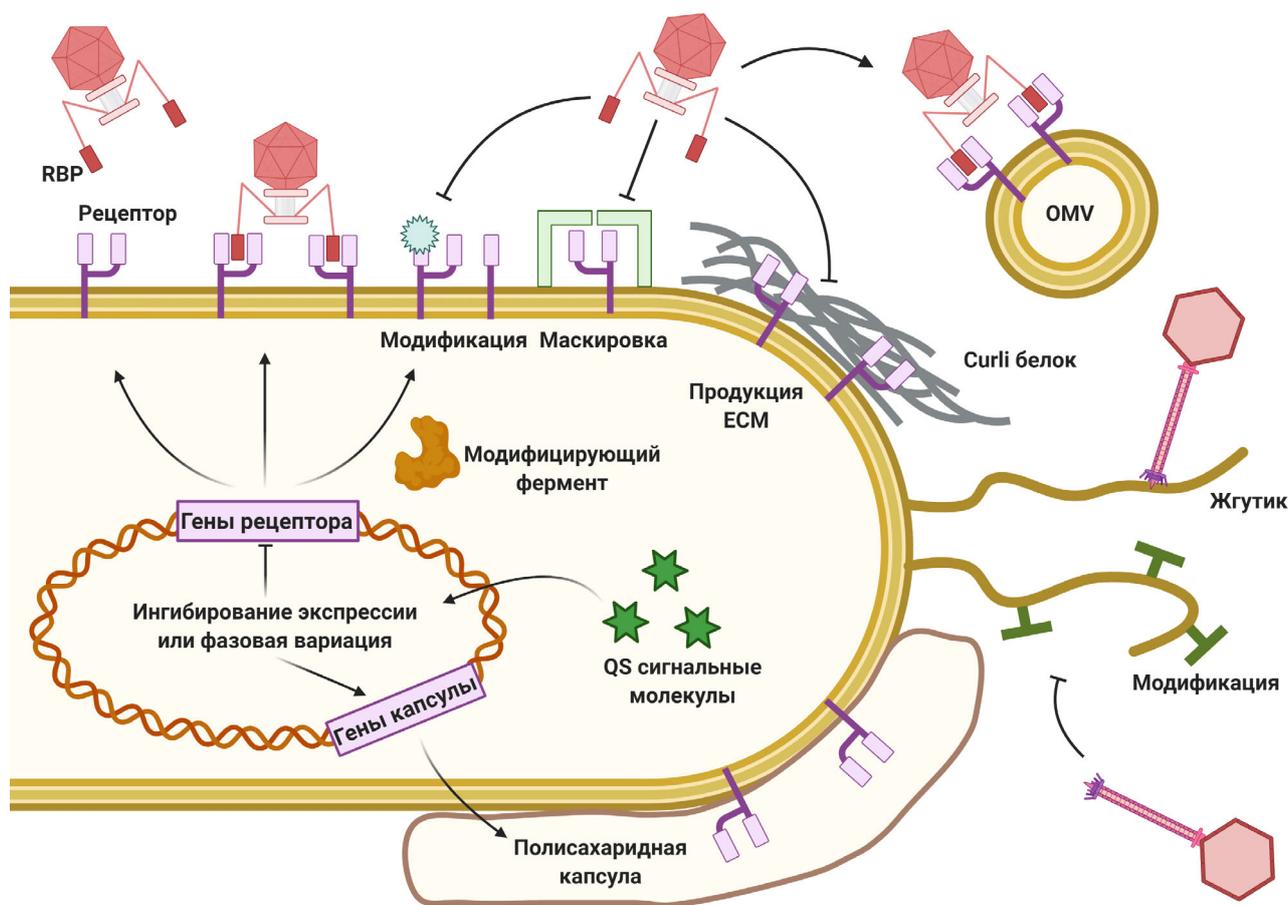


Рис. 2. Микробные стратегии, позволяющие предотвратить распознавание фагами

меры, формирующие ЕСМ, а пространственно-структурированные сообщества клеток, окруженные ЕСМ, образуют биопленки [54, 55]. Хотя подробности взаимодействий фагов и клеток-хозяев в биопленках полностью не выяснены [56], было показано, что микробные сообщества в биопленках более устойчивы к действию вирусов. Повышенное давление со стороны фагов даже может приводить к усиленному образованию биопленок, в которых поверхностные клеточные рецепторы становятся менее доступными для вирусов [57, 58]. Другим преимуществом пространственной организации является то, что в окружающей среде фаги могут воздействовать только на поверхностный слой клеток. Часто расположенные в этом слое клетки метаболически неактивны и таким образом не позволяют размножаться фагам, снижая при этом шансы атаки на нижележащие клетки [59]. Компоненты ЕСМ также могут выполнять функцию ловушек или «поглотителей», которые адсорбируют и иммобилизуют фаги еще до того, как последние достигнут поверхности клеток [60, 61]. Было показано, что белки *csgI*, являющиеся компонентами ЕСМ, ассоциированы с повышенной фагорезистентностью биопленок *E. coli*, в то время как секрета экзополисахарида альгината защищает клетки *Pseudomonas fluorescens* [62, 63]. Другим способом предотвращения адсорбции фагов является образование полисахаридной капсулы [64], например, повышенная продукция колановой кислоты ассоциируется с устойчивостью клеток *Escherichia* к различным фагам, и в результате фаговой инфекции может произойти отбор мукоидных клеток с мутациями в сигнальном пути RCS, контролирующем эту функцию [44, 65]. Роль ловушек также была показана для внеклеточных везикул, образуемых клетками *Vibrio* и *Escherichia*. Такие везикулы, содержащие поверхностные рецепторы, могут адсорбировать фаги, тем самым понижая их титр в окружающей среде [66, 67]. С другой стороны, для *Bacillus* было показано, что везикулы, переносящие рецепторы, могут встраиваться в мембрану других невосприимчивых клеток, делая их чувствительными к инфекции [68].

Изменения структуры рецепторов. Адсорбцию фагов часто можно рассматривать как двухэтапный процесс, в котором на первой стадии происходит обратимое связывание фага с экспонированными на поверхности клетки структурами (например, фаг T5 связывается с O-антигеном LPS на поверхности клеток *E. coli*, в то время как фаг SSP1 связывается с тейхоевой кислотой клеточной стенки *Bacillus subtilis*). Затем происходит необратимое прикрепление ко вторичному рецептору (например, к белкам

FhuA или YueB в случае T5 или SSP1 соответственно) [51]. Изменения первичных и вторичных поверхностных рецепторов являются распространенным способом приобретения резистентности к фагам [69]. Даже точечные мутации в генах белков-рецепторов могут влиять на эффективность взаимодействия с фаговыми RBP, как было показано, например в случае рецептора FhuA фага T5 или рецептора LamB фага λ [70, 71]. Мутации, затрагивающие пути биосинтеза, которые ответственны за синтез компонентов клеточной стенки (LPS — у грамотрицательных бактерий или тейхоевой кислоты — у грамположительных бактерий), могут приводить к изменению структуры этих молекул и таким образом оказывать влияние на процесс распознавания клеток фагами, нацеленными на эти рецепторы [72, 73]. Внеклеточные супраструктуры бактерий также могут служить в качестве рецепторов фагов, и известно, что мутации в генах, участвующих в образовании пилей или жгутиков, могут обеспечить защиту от фагов [74, 75].

Мутации рецепторов вряд ли можно рассматривать непосредственно как стратегию защиты, поскольку фаговая инфекция лишь отбирает в популяции ранее существовавшие резистентные клетки. В то же время специфические механизмы, контролирующие доступность рецепторов, также существуют. Молекулы на поверхности клетки вовлечены во многие важные для прокариот процессы, включая подвижность или транспорт питательных веществ, и их мутации могут быть связаны с издержками на поддержание жизнедеятельности клеток. Поэтому фазовые вариации (обратимое переключение экспрессии генов) или маскировка рецепторов могут быть более безопасной долгосрочной стратегией по сравнению с мутациями [76, 77]. Маскировка включает синтез молекул, которые связываются с рецепторами хозяина и физически блокируют взаимодействие с фаговыми RBP, как в случае связывания белка TraT с рецептором OmpA у *E. coli* [78]. Временные химические модификации рецепторов также могут препятствовать их распознаванию. В качестве примеров можно привести гликозилирование пилей у *Pseudomonas aeruginosa* или глюкозилирование O-антигена клеток *Salmonella enterica* [79, 80]. Транскриптомные исследования показали, что маскирующие изменения рецепторов могут быть частью общего ответа на стресс как в случае *Lactococcus lactis*, когда фаговая инфекция активирует гены, ответственные за D-аланилирование клеточной стенки [81]. Снижение уровня экспрессии рецепторов путем фазовой вариации может быть достигнуто рекомбинацией или предрасположенными изменениями в про-

моторных областях [82, 83], в то время как мутации в специфических «горячих точках» внутри генов могут привести к сдвигу открытой рамки считывания и образованию укороченной формы белка [84]. Системы, допускающие множественные инверсии, известны как шаффлоны, и также могут быть вовлечены в регуляцию экспрессии рецепторов [85], как в случае PtlV, кодируемого плазмидой IncI из *E. coli*, где для экспрессии белка может быть выбран один из семи вариантов его С-концевого участка [86]. Было показано, что распространенный симбионт кишечника человека *Bacteroides thetaiotaomicron* использует фазовую вариацию, по крайней мере в 19 локусах, контролируя продукцию различных типов капсул и экспрессию белков S-слоя [87]. Фазовые вариации допускают сосуществование микробных субпопуляций, экспрессирующих различные варианты генов, что позволяет им найти баланс в защите от фаговых инфекций и воздействия факторов окружающей среды.

Структура клеточной стенки архей сильно отличается от бактериальной, и процесс прикрепления вирусов к поверхности клеток архей изучен довольно слабо [88]. Недавно была впервые предложена структурная модель связывания археофага STIV с пили-подобной структурой клеток *Sulfolobus* [89]. Было показано, что мутации в генах, ассоциированных с поверхностными молекулами клеток *Sulfolobus*, обеспечивают резистентность клеток к SIRV2 [90]. Несмотря на отсутствие данных, можно ожидать, что механизмы, подобные описанным для бактериальных клеток, также предотвращают адсорбцию вирусов архей.

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ЗАЩИТА ОТ ФАГОВ

Непосредственное участие в защите. В многочисленных ранних исследованиях изучалось влияние различных химических соединений на эффективность вирусной инфекции [91–93]. Было показано, что некоторые соединения, включая синтезируемые бактериями антибиотики, могут влиять на производство фагового потомства в концентрациях, субингибиторных для роста бактерий [94–96]. Также было известно, что ДНК-специфичные красители и интеркалирующие агенты (например, пропидиум иодид или доксорубин) могут инактивировать фаговые частицы [97]. Однако лишь недавно была произведена переоценка роли малых молекул, продуцируемых бактериями, в их защите от фагов [27]. В результате проведения высокопроизводительного скрининга библиотек химических

соединений были выявлены молекулы, которые способны препятствовать инфицированию клеток *E. coli* фагом λ , при этом не влияя на рост бактерий. Противофаговая активность была также показана в биологически значимом контексте: добавление отработанной культуральной среды, собранной после роста штамма *Streptomyces peucetius*, продуцирующего доксорубин и даунорубин, приводило к ингибированию процесса инфицирования штамма *Streptomyces coelicolor*, чувствительного к действию фага. Далее авторы показали, что ~1/3 протестированных экстрактов клеток *Streptomyces* обладают противофаговой активностью в отношении природных изолятов актинофагов, что позволяет предположить, что химическая защита является широко распространенной защитной стратегией. В качестве активных компонентов большинства экстрактов были обнаружены антрациклины или другие ДНК-интеркалирующие агенты. Отдельные ДНК-интеркалирующие агенты способны инактивировать фаговые частицы до их контакта с клеткой путем провоцирования неконтролируемого выхода ДНК из капсида [98]. Однако было показано, что в случае дауномицина фаговая ДНК может проникнуть в клетки, хотя ранние стадии инфекции при этом были подавлены [27]. Результаты работы подняли ряд вопросов, касающихся механизмов ингибирования малыми молекулами, их специфичности и избегания токсичности для продуцирующих бактерий, а также возможности использования противовирусных метаболитов в качестве общественного ресурса в микробных популяциях.

Вайперины и нуклеотиды, обрывающие рост цепи. Интерферон-индуцированный противовирусный ответ высших эукариот, в том числе и человека, включает активацию фермента вайперины, ответственного за синтез рибонуклеотида ddhСТР, обрывающего синтез новых цепей РНК [99]. Предполагается, что обрыв цепи подавляет вирусную транскрипцию и ингибирует репликацию вирусов с РНК-геномами [100]. Гены вайперинов спорадически обнаруживались в геномах отдельных видов бактерий и архей. Недавнее исследование показало, что прокариотические вайперины (pVips) обеспечивают защиту от фаговой инфекции [101, 102]. В отличие от эукариотических гомологов, синтезирующих ddhСТР, pVip также продуцируют ddhУТР и ddhГТР. Гетерологичная экспрессия различных pVip в *E. coli* ингибировала инфекцию фагом T7 и транскрипцию, опосредованную РНК-полимеразой T7 [102]. Экспрессия pVip не влияла на транскрипцию хозяина и не оказывала токсичный эффект на клетки, что позволяет предположить более высокую чувствительность

вирусных РНК-полимераз к ингибированию с участием ddhNTP. Интересно, что экспрессия p*Vir* обеспечивала более высокий уровень защиты от фагов P1 и λ , которые используют хозяйскую РНК-полимеразу для транскрипции своих генов, подразумевая существование дополнительных защитных механизмов, ассоциированных с вайперинами. Гены p*Vir* в больших количествах обнаруживаются внутри защитных островков и часто находятся рядом с генами, кодирующими нуклеотидкиназы, которые могут образовывать NTP из NMP и таким образом повышать уровень NTP как субстратов для p*Vir*. Гены HicA-подобной РНКазы или белков, содержащих домен анкириновых повторов, предположительно участвующие в идентификации фаговой инфекции [102], также обнаруживались вблизи некоторых генов p*Vir*.

Регулирующая роль. Малые метаболиты также могут участвовать в защите бактерий от фагов в качестве сигнальных молекул или в качестве кофакторов иммунных белков. Примеры последнего будут описаны позднее, а здесь мы рассмотрим косвенную роль малых молекул в регуляции экспрессии генов, обеспечивающих защиту клеток. Феномен определения кворума (QS, Quorum Sensing) позволяет клеткам измерять плотность микробной популяции и может рассматриваться как система коммуникации, основанная на секреции малых молекул [103]. Популяции с высокой плотностью клеток более уязвимы к фаговым инфекциям, и QS-опосредованная активация защитных барьеров с увеличением плотности культуры полезна для выживания. Например, в селекционных экспериментах было показано, что QS-профицитная культура *P. aeruginosa* достигает более высокого уровня резистентности к фагам по сравнению с QS-дефицитными клетками [104]. Кроме их роли в образовании биопленок [105], QS-сигналы могут регулировать экспрессию генов фаговых рецепторов и иммунных систем. Например, обработка лактоном N-ацилглосерина приводит к снижению количества рецепторов фага λ в клетках *E. coli* [106]. А в случае клеток *Vibrio anguillarum* эта обработка вызывает секрецию внеклеточных протеаз и снижает количество рецепторов для фага KVP40 [107, 108]. Было показано, что QS-регуляция активирует экспрессию компонентов систем CRISPR-Cas в клетках *Serratia*, *Pseudomonas* и других бактерий [109, 110]. Для принятия решения о лизисе или лизогении многие фаги используют бактериальные QS-сигналы или кодируют собственные сигнальные системы, как это недавно было описано для системы arbitrium [111–114]. Можно предположить, что в случае фаговой инфек-

ции бактерии способны перехватывать молекулы межвирусной коммуникации или вырабатывать собственные специфические сигналы для мобилизации защитных барьеров в популяции.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОНИКНОВЕНИЯ ГЕНОМА ФАГА

Вслед за адсорбцией геном фага выходит из капсида и транспортируется внутрь клетки-хозяина [115]. Существует несколько механизмов, блокирующих эту стадию жизненного цикла вируса [116]. Как правило, такие системы кодируются профагами и лежат в основе феномена исключения суперинфекции (Sie), т.е. предотвращения вторичной инфекции гомоиммунными фагами после установления первичной инфекции (или лизогенизации) [117]. Мембранно-ассоциированные белки Sie могут блокировать вход фаговой ДНК в клетку путем воздействия на фаговый белок TMP (tape measure protein), как это имеет место в случае экспрессии липопротеина профагом TP-J 34 в клетках *Streptococcus thermophilus* [118, 119] или белка gp15 профагом HK97 в клетках *E. coli* [120, 121]. Известно, что белок Sp фага T4 ингибирует лизоцим этого же фага, который необходим для деградации пептидогликанового слоя клеточной стенки *E. coli* [122]. Предполагается, что клеточные белки хозяина, необходимые для транслокации фаговой ДНК, также могут являться мишенями для Sie, как в случае защиты, опосредованной белком Imm фага T4 [122, 123] или белком gp52 микобактериофага Fruitloop, который взаимодействует с белком Wag31 клетки-хозяина и ингибирует инфицирование клеток Wag31-зависимыми фагами [124]. Системы Sie с неизвестными мишенями были описаны в случае фага Tuc2009 *Lactococcus lactis* [125], фага P22 *S. enterica* [126], фага K139 *Vibrio cholerae* [127], фага P1 *E. coli* [128] и В3-подобных фагов клеток *P. aeruginosa* [129]. Несмотря на то что системы Sie рассматриваются в первую очередь как средства конкурентной борьбы между фагами [130], они способны принести пользу для клетки-хозяина и в конечном итоге могут стать неотъемлемой частью хромосомы, как в случае белка DicB, кодируемого криптоическим профагом Qin у *E. coli* [131].

ИММУННЫЕ СИСТЕМЫ, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ МОДИФИКАЦИИ ДНК

Как только геном фага попадает внутрь клетки, он становится мишенью для действия

различных ферментов, которые способны вызвать его деградацию. Например, комплекс нуклеазы/хеликазы RecBCD, который также участвует в репарации ДНК хозяина, распознает свободные концы ДНК, доступные на ранних стадиях инфицирования фагами с линейными ДНК геномами [132, 133]. Наиболее часто деградацию ДНК, попадающей в клетку, осуществляют системы врожденного и адаптивного иммунитета. Модификация ДНК клетки-хозяина, которая необходима для того, чтобы дифференцировать собственную ДНК и чужеродный генетический материал, является отличительным признаком систем рестрикции-модификации. Модификационный модуль этих систем ответственен за эпигенетическое мечение ДНК клетки-хозяина, и поэтому немеченая фаговая ДНК является объектом для эндонуклеазного расщепления в результате действия рестриционного модуля [134, 135]. Общий принцип механизма действия R-M представлен на рис. 3. Кроме классических систем R-M, множество недавно описанных защитных систем кодируют модификационный модуль, в то время как их механизмы рестрикции чужеродного генетического материала все еще не выяснены.

Классические системы R-M. Системы R-M были открыты в начале 1950-х годов в процессе изучения феномена модификации вирусами клетками-хозяевами [136, 137]. Они были хорошо изучены в первые годы молекулярной биологии, что привело к их широкому применению и появлению технологий рекомбинантной ДНК [138]. Более 300 тысяч известных или предполагаемых R-M-ферментов в настоящее время находятся в базе данных REBASE, а системы R-M были обнаружены в ~90% секвенированных геномов бактерий и архей [30]. Функциональные субъединицы систем R-M состоят из метилтрансферазы (МТазы, MTase), которая переносит метильную группу от молекулы-донора S-аденозилметионина (SAM) к цитозину или аденину в ДНК, и сопряженной эндонуклеазы рестрикции (ЭР, REase). Отдельные системы также кодируют транслоказу, которая использует энергию гидролиза АТФ для осуществления моторных функций, и субъединицу, которая содержит домены распознавания мишени (TRD), определяющие специфичность ЭР и МТазы к определенным последовательностям. В зависимости от состава субъединиц потребности в кофакторах и механизма действия системы R-M подразделяются на 4 типа. Однако эта классификация не отражает их эволюционного родства [139, 140]. Состав субъединиц для комплексов, ответственных за модификацию и рестрицию, примеры сайтов распознавания и пат-

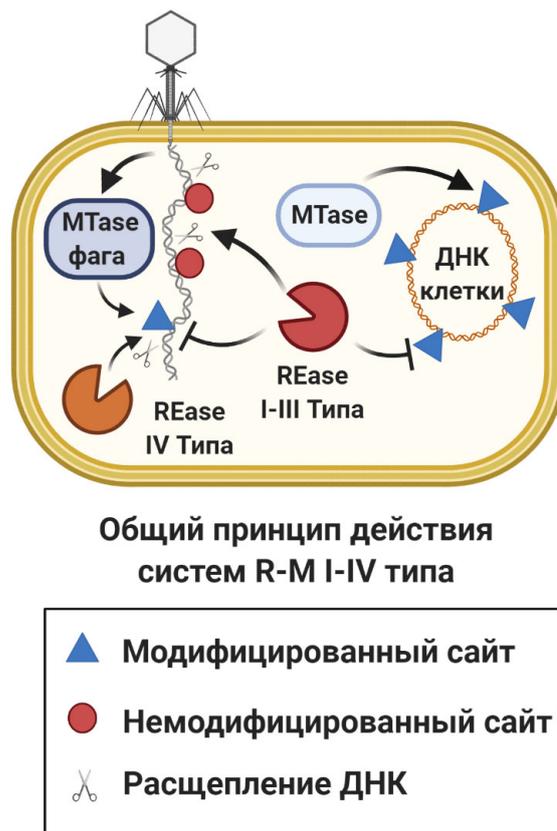


Рис. 3. Принцип действия классических систем рестрикции-модификации. Метилтрансфераза (МТаза, MTase) из систем типа I–III модифицирует специфические мотивы в ДНК клетки-хозяина, в то время как неметилированные участки в чужеродной ДНК подвергаются расщеплению эндонуклеазой рестрикции (ЭР, REase). ЭР IV-го типа существует без сопряженной МТазы и расщепляет ДНК, модифицированную вирусом

терны расщепления для систем R-M типов I–IV представлены на рис. 4.

R-M II-го типа наиболее изучена. Системы этого типа обычно состоят из отдельных белков МТазы и ЭР. МТаза является мономером, в то время как ЭР действует как гомодимер. Как правило, оба фермента распознают один и тот же палиндромный участок ДНК длиной 4–8 пар оснований. Расщепление ДНК происходит на обеих цепях ДНК в фиксированном положении внутри или в непосредственной близости от неметилированного сайта распознавания, и этот процесс зависит от наличия двухвалентных катионов, в большинстве случаев от Mg^{2+} [141, 142]. МТаза эффективно метилирует неметилированные и полуметилированные сайты, которые образуются после репликации полностью метилированной ДНК, в то время как ЭР обладает низким сродством к метилированным или полуметилированным сайтам [143]. Помимо описанного простого способа действия, харак-

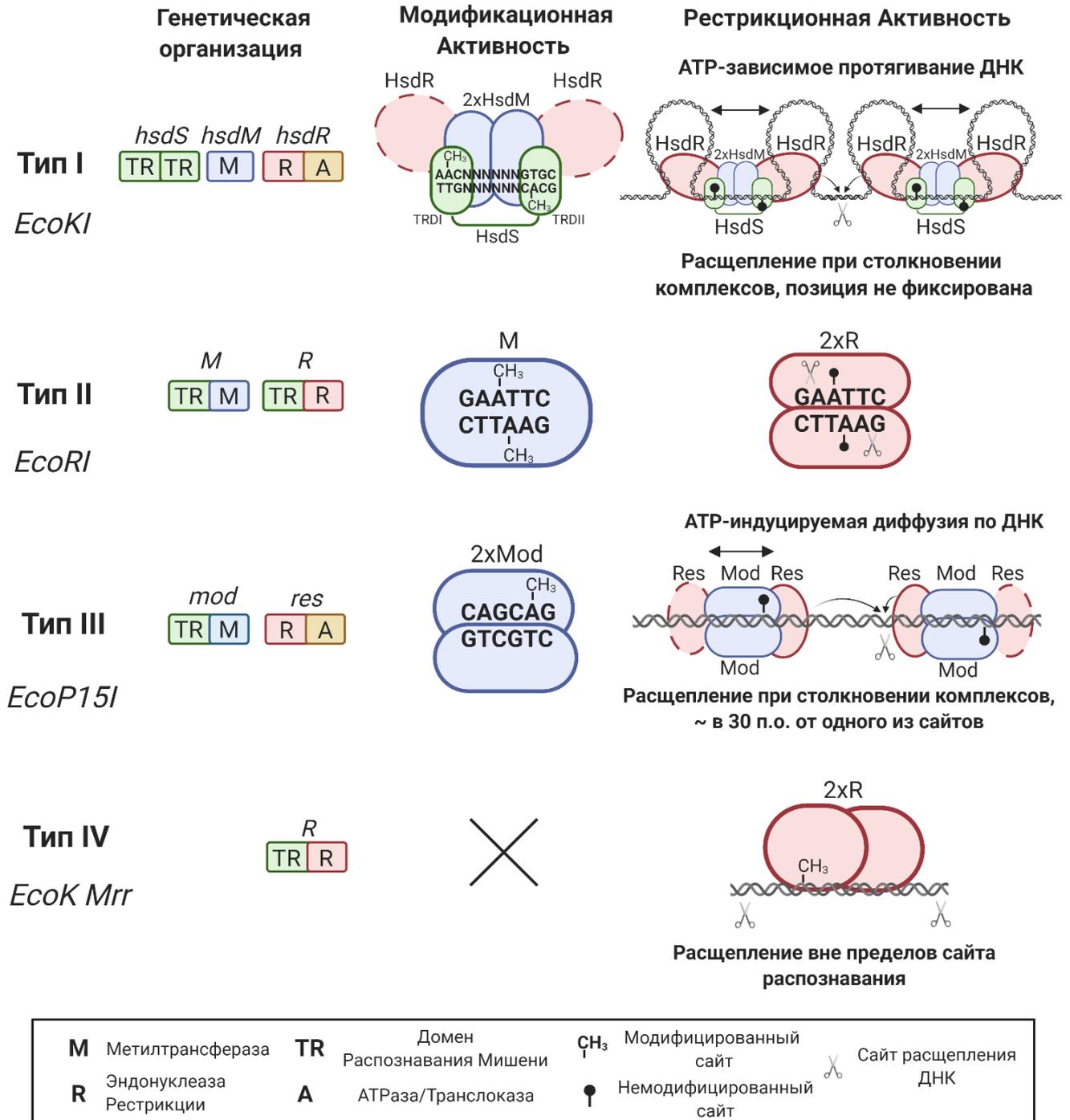


Рис. 4. Функциональные субъединицы, сайты распознавания, состав комплексов модификации и рестрикции для репрезентативных членов систем R-M типов I–IV. Системы R-M типа I модифицируют обе цепи двухчастных асимметричных участков ДНК. Для рестрикции необходимо взаимодействие между двумя комплексами, связанными с неметилованными участками ДНК, которое достигается благодаря АТФ-зависимой транслокации, при этом позиция сайта рестрикции не фиксирована. Системы R-M типа II обычно распознают палиндромные сайты, и обе цепи ДНК внутри или в непосредственной близости от неметилованных сайтов подвергаются расщеплению. Система R-M типа III модифицирует только одну цепь в асимметричном сайте распознавания, и расщепление происходит в фиксированной позиции относительно одного из сайтов, когда комплекс рестрикции, связанный с неметилованным сайтом, взаимодействует с другим комплексом, активированным в результате распознавания близлежащего неметилованного сайта в обратной ориентации. Система R-M типа IV не содержит метилтрансферазы и расщепляет молекулу ДНК после распознавания специфичных модифицированных сайтов. Пунктирной линией показано, что данная субъединица может быть необязательной для указанной активности

терного для подтипа II, ферменты, принадлежащие к другим подтипам, могут обладать необычными свойствами [139]. Например, ферменты подтипов IA, IS и IL распознают асимметричные сайты в ДНК, в подтипах IS и IL полипептиды ЭР и МТазы слиты в один белок; в то время как ферменты подтипов IE и IF требуют связывания с двумя сайтами для расщепления. Ферменты подтипов IL и IG (например, MteI и Eco571) распознают асимметричные сайты, которые метилированы только по одной цепи ДНК [144, 145]. Вторая цепь сайтов Eco571 подвергается метилированию с участием дополнительной метилтрансферазы [145]. В то же время все еще не выяснено, как в системах подтипа IL избегается расщепление неметилированных сайтов, образующихся после репликации ДНК. Избыточная экспрессия ЭР токсична для клетки, в то время как избыток МТазы может привести к метилированию геномов инфицирующих фагов и их защите от последующей рестрикции. Таким образом, для систем R-M необходима координированная регуляция экспрессии генов МТазы и ЭР, что достигается, например, в результате активности контролирующего С-белка [146, 147] или при связывании МТазы со своим промотором и/или его метилированием [148].

Системы R-M типа I кодируют МТазу (HsdM), ЭР (HsdR) и субъединицу, обеспечивающую их специфичность (HsdS). Наиболее хорошо изученным примером является рестриктаза EcoKI. Эти ферменты работают в виде комплексов HsdM₂-HsdS₁-HsdR₂, которые могут осуществлять как рестрикцию, так и метилирование, в то время как метилирование также может осуществляться комплексами HsdM₂-HsdS₁ или HsdM₂-HsdS₁-HsdR₁ [149–151]. Два участка ДНК, разделенные вырожденной последовательностью (~AACNNNNNGTGC для EcoKI), распознаются двумя TRD-доменами на субъединице HsdS, и обе цепи ДНК этих асимметричных участков подвергаются метилированию. Механистическая модель рестрикционной активности достаточно сложна. После распознавания неметилированного сайта рестрикционным комплексом активируется АТФ-зависимая моторная функция субъединицы HsdR, и комплекс протягивает через себя связанную молекулу ДНК в обоих направлениях, создавая петли [152]. Транслокация расходует ~3 молекулы АТФ на один нуклеотид [153]. Расщепление происходит при столкновении двух комплексов рестрикции, закрепленных на разных сайтах, или в случае, если дальнейшая транслокация ДНК осложнена (например, при столкновении с репликационной вилкой или в суперспирали-

зованных участках) [154]. Расщепление ДНК происходит в нефиксированной позиции между соседними участками распознавания [155]. Для R-M I-го типа необходим SAM, причем не только в качестве донора метильных групп, но и как кофактор комплекса рестрикции. Ферменты подтипа ISP представляют одиночные полипептиды, сочетающие в себе метилирующую и рестрикционную активности, при этом модификации подвергается только одна цепь ДНК [156, 157]. Чтобы снизить риск повреждения ДНК клетки-хозяина, может осуществляться дополнительный контроль активности комплексов I-го типа. Например, в результате ClpXP-опосредованного протеолитического расщепления субъединицы HsdR – феномен, известный как аллелиация рестрикции [158, 159]. Известно, что благодаря фазовой вариации TRD-доменов может происходить изменение специфичности ферментов I-го типа к сайтам распознавания [160].

Системы R-M типа III во многом похожи на системы I-го типа [161]. Они функционируют как мультибелковые комплексы, состоящие из субъединиц Mod и Res. Модификация ДНК происходит в результате действия гомодимера Mod₂, а комплексы Res₂-Mod₂ или Res₁-Mod₂ выступают в качестве АТФ- и SAM-зависимой эндонуклеазы рестрикции [162, 163]. Ферменты III-го типа распознают короткие непалиндромные последовательности и метилируют только одну цепь ДНК. Таким образом, подобно ситуации с ферментами подтипа ISP, половина из полуметилированных участков после репликации становится неметилированными. Чтобы предотвратить атаку комплекса рестрикции на ДНК клетки-хозяина, для осуществления расщепления требуется наличие двух сайтов в противоположной ориентации (голова к голове или хвост к хвосту), т.е. чтобы два неметилированных соседних участка были локализованы на различных цепях ДНК, что обычно не встречается в ДНК хозяина [164, 165]. Распознавание неметилированного участка ДНК приводит к инициации транслокационной активности субъединицы Res. Однако, в отличие от ферментов I-го типа, при этом расходуются меньше АТФ, и вместо двунаправленного протягивания ДНК через комплекс запускается одномерная диффузия вдоль цепи ДНК [166, 167]. Расщепление ДНК происходит в фиксированной позиции от одного из сайтов распознавания, когда подвижный активированный комплекс рестрикции взаимодействует с другим комплексом, остающимся связанным с неметилированным сайтом. Экспрессия субъединицы Mod также может регулироваться путем фазовой вариации [168].

Чтобы избежать расщепления рестриктазы клетки-хозяина, фаги могут включать в свой геном модифицированные основания [169]. В ответ на это у прокариот возникли системы R-M IV-го типа, специфические к модифицированным участкам ДНК [170, 171]. Тип IV – это разнообразная и мало изученная группа одиночных эндонуклеаз рестрикции, у которых отсутствуют сопряженные метилтрансферазы. Ферменты подтипа ПМ также распознают метилированные основания, и некоторыми авторами рассматриваются как ферменты типа IV [171]. ЭР типа IV обычно обладают широкой субстратной специфичностью, и их действие может быть направлено на метилцитозины (McrA), метил-аденины (Mrr) или ДНК с фосфоротиоатными связями (ScoMcrA) [172–174]. Некоторым ферментам из этой группы для расщепления требуется гидролиз АТР или ГТР и наличие более одного сайта рестрикции (McrBC или SauUSI) [175, 176]. Распространение этих белков и их экологическое значение, вероятно, все еще остается недооцененным.

Кроме их роли в защите от фагов и контроле горизонтального переноса генов, системы R-M оказывают влияние на другие биологические процессы [177]. Например, гены метилтрансфераз часто обнаруживаются без сопряженных генов рестриктаз, и считается, что такие орфанные ферменты участвуют в регуляции экспрессии или репликации генов. Наиболее изученными примерами являются Dam МТаза у *E. coli* и SsrM – у *Caulobacter crescentus* [178, 179]. Некоторые системы R-M могут рассматриваться как эгоистичные элементы типа токсин-антитоксин, поскольку потеря гена МТаза может привести к постсегрегационной гибели клетки, связанной с повреждением ДНК в результате действия рестриктазы [180]. Эволюционная и экологическая роль систем R-M также рассмотрена в ряде других обзоров [76, 181–183].

Система ограничения роста бактериофагов (Phage Growth Limitation, Pgl). Система Pgl может представлять уникальный пример обратной рестрикции-модификации, при которой модифицированная ДНК подвергается рестрикции, но в отличие от систем R-M типа IV, модификация генома фага осуществляется самой системой защиты клетки-хозяина. Система Pgl была впервые описана при выделении фага φC31 на газоне клеток *Streptomyces coelicolor* A(3)2 [184]. Позднее было показано, что потомство фага φC31 высвобождается из клеток Pgl+ после первого раунда инфекции, но последующие раунды инфицирования клеток-хозяев были подавлены [185]. Было предположено, что вышедшие из клеток Pgl+ фаги несут Pgl-специфичные модификации.

Система Pgl была обнаружена только у *Actinomyces*. Считается, что такое альтруистическое поведение может быть обеспечено многоклеточными бактериями, которые способны пожертвовать одним компартментом ради защиты всего организма. В то же время Pgl-фенотип может обеспечить конкурентное преимущество в борьбе с родственными Pgl-дефицитными клетками, так как клетки Pgl+ постоянно продуцируют модифицированные фаговые частицы, способные поражать другие клетки, но не действующие на Pgl+ хозяина [186]. Фенотип Pgl имеет и дополнительное преимущество: в случае классических систем R-M случайное метилирование генома фага часто приводит к появлению защищенного фагового потомства, которое будет способно уничтожить популяцию бактерий. Напротив, обратный механизм действия, характерный для Pgl, гарантирует, что в ходе инфекционного процесса не появятся фаги, которым удастся избежать рестрикции (рис. 5).

Система Pgl кодирует 4 компонента: PglX – аденин-метилтрансферазу, PglY – АТРазу, PglW – протеинкиназу и PglZ – щелочную фосфатазу (рис. 6, а) [187–189]. Для защиты необходимы все четыре белка, при этом активность первых трех компонентов была показана *in vitro* [190]. Делеция гена *pglZ* в присутствии функционального *pglX* невозможна. Поэтому было предположено, что белки, кодируемые этими генами, образуют пару токсин-антитоксин, а PglX играет ключевую роль в рестрикции, когда его активность не сдерживается белком PglZ [190]. До сих пор неизвестно, как система Pgl распознает фаговую инфекцию и как работает модуль рестрикции.

Системы исключения бактериофагов (Bacteriophage EXclusion, BREX). Глобальный анализ распространения гена *pglZ* в защитных островках показал, что он обнаруживается не только у *Actinomyces*, но также часто встречается в консервативных кластерах генов, отличных от Pgl-системы [18]. Было предположено, что *pglZ*-содержащие кластеры представляют новое суперсемейство систем защиты от фагов, которое было названо BREX [191]. Исходя из состава компонентов, системы BREX были классифицированы на 6 типов, и Pgl был отнесен к BREX типа II (рис. 6, а). Кроме наличия PglZ, общей чертой всех систем BREX является присутствие АТРазы и метилтрансферазы. В системах IV-го типа метилтрансфераза заменена на PAPS-редуктазу – фермент, участвующий в фосфоротиоилировании ДНК [192]. Наиболее распространенным является BREX типа I, и системы этого типа были экспериментально изучены в клетках *B. subtilis*, *E. coli* и *V. Cholerae* (где BREX встреча-

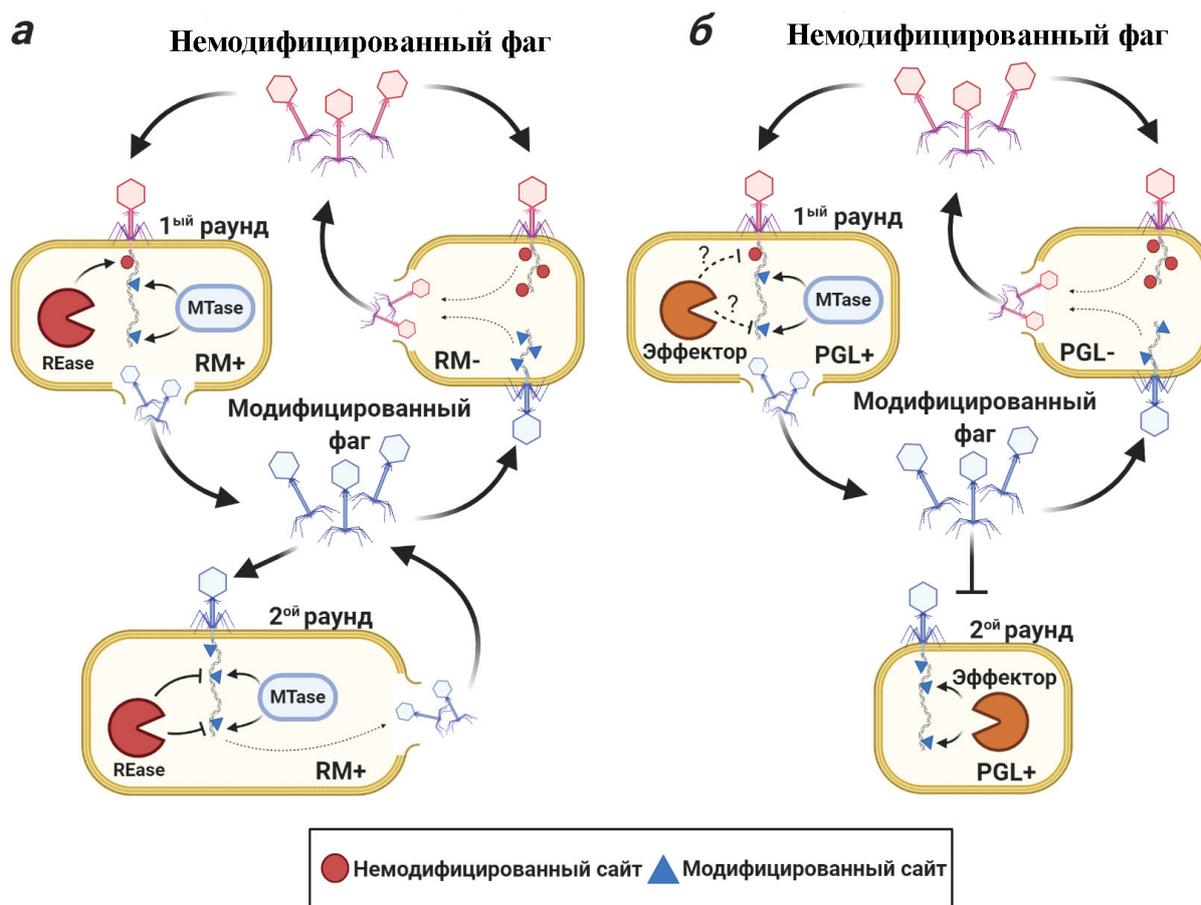


Рис. 5. *a* – Прямой механизм действия рестрикции-модификации: ошибочное метилирование фаговой ДНК во время инфекции клеток, обладающих классической системой R-M (RM+), приведет к образованию потомства фага, которое будет способно продолжить эффективное инфицирование клеток RM+. Модификации могут быть утрачены только после прохождения фага через R-M-дефицитные клетки (RM-). *б* – Обратный механизм действия системы рестрикции-модификации, который предполагается для системы Pgl: после первого раунда инфекции клетки Pgl+ продуцируют Pgl-модифицированные фаговые частицы, которые подвергаются рестрикции в клетках Pgl+ во время второго раунда инфекции. Pgl-модифицированный фаг может эффективно инфицировать клетки Pgl-

ется в SXT конъюгативных элементах) [191, 193, 194]. Активность BREX метилтрансферазы также была показана для клеток *Lactobacillus casei* [195]. Основными компонентами систем BREX типа I являются VrxX (PglX) – аденин-специфичная метилтрансфераза, VrxZ (PglZ) – щелочная фосфатаза, VrxC – АТРаза, VrxL – Lon-подобная протеаза и небольшой белок VrxB с неизвестной функцией. Эти предсказанные активности не были подтверждены *in vitro*, и функция отдельных крупных доменов белков BREX все еще не определена. Также могут присутствовать дополнительные небольшие белки, которые, как предполагается, играют регуляторную роль или необходимы для обеспечения защиты от определенных фагов (например, VrxA) [191, 193].

Было показано, что, подобно классическим системам R-M, системы BREX метилируют собственную ДНК клетки-хозяина, и наличие

BREX-специфических модификаций в геноме фага позволяет ему преодолеть защитную систему [193, 196]. Сайты системы BREX не являются палиндромами и метилируются только по одной цепи, что, подобно R-M системам типа III и подтипа ISP, может подразумевать требование наличия нескольких сайтов и их специфической ориентации для осуществления рестрикции. BREX действует на ранних стадиях фаговой инфекции и препятствует накоплению вирусной ДНК внутри клеток. Тем не менее механизмы рестрикции остаются невыясненными. Защита BREX системы *E. coli* подавляется ДНК-мимикрирующим белком Osg фага T7 [46], который является хорошо известным ингибитором систем R-M типа I [151, 197]. Этот результат, по-видимому, предполагает наличие общих механистических особенностей для систем BREX и мультисубъединичных комплексов систем R-M.

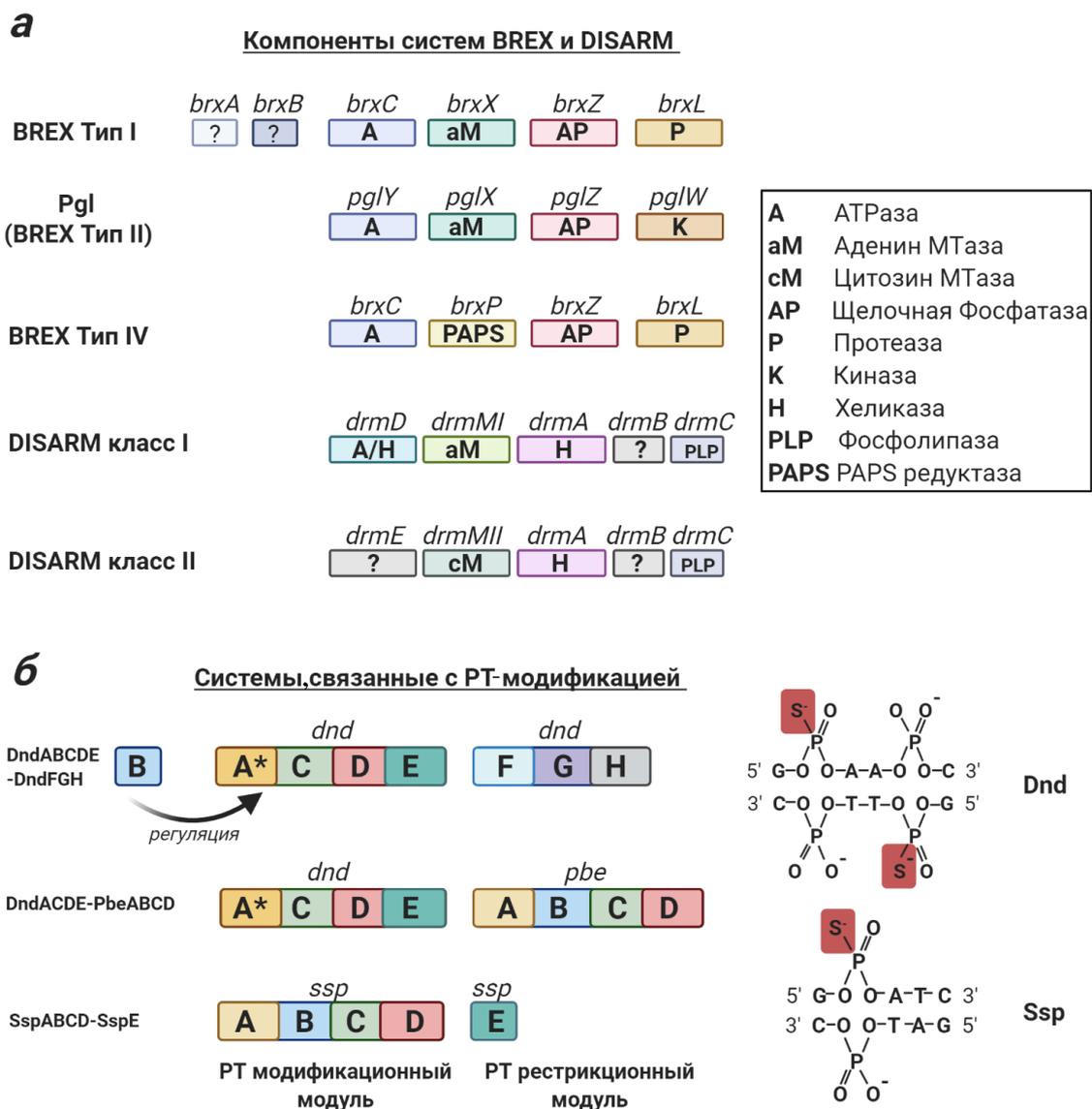


Рис. 6. а – Функциональные субъединицы, характерные для различных типов систем BREX и DISARM. Порядок расположения компонентов на схеме не всегда отражает действительную организацию генов в опероне. **б** – Системы, основанные на фосфоротиолировании сахаро-фосфатного остова ДНК. Из-за транзientного характера РТ-модификации лишь малая часть сайтов действительно является модифицированной в геноме, и мотивы Dnd систем могут оставаться полумодифицированными

Системы DISARM. Вслед за открытием BREX подробное изучение консервативных кластеров генов в защитных островках привело к предсказанию еще одной новой системы – DISARM (Defence Island System Associated with Restriction-Modification) [198]. Противовирусная активность DISARM была исследована на примере системы из *Bacillus paralicheniformis*. Она состоит из 5 компонентов: хеликазы DrmA, белка DrmB, содержащего домен DUF1998 с неустановленной функцией, белка DrmC, содержащего домен фосфолипазы D (PLD), белка DrmE и цитозин-специфичной метилтранс-

феразы DrmMII [198]. Этот состав характерен для DISARM класса 2, в то время как в более распространенных системах класса 1 белок DrmMII заменен на аденин-метилтрансферазу DrmMI, а белок DrmE – на SNF-2-подобную хеликазу DrmD (рис. 6, а). Домены PLD могут быть вовлечены в каталитическую активность нуклеаз [199]. Тем не менее DrmC не оказался необходимым для DISARM-опосредованной защиты от фагов. Экспрессии одного лишь белка DrmMII достаточно для метилирования симметричных сайтов (CCWGG) в ДНК хозяина, а делеция гена метилтрансферазы в присутствии

полного кластера DISARM является токсичной для клеток. Но в отличие от классического фенотипа R-M, фаг φ3T с DISARM-специфичным метилированием был неспособен инфицировать клетки DISARM+, что позволяет предположить, что метилирование необходимо, но недостаточно для того, чтобы избежать рестрикции [198]. Подобно BREX, DISARM не влияет на адсорбцию фага и ингибирует ранние стадии инфекции по неизвестному механизму.

Системы DPD. Помимо метилирования ДНК, модификации на основе 7-деазагуанина также могут быть связаны с R-M-подобными защитными системами [200]. В синтезе 7-деазагуанина, который обычно выступает как предшественник модифицированных оснований в молекуле транспортной РНК, участвуют несколько ферментов. Некоторые прокариоты кодируют дополнительные кластеры генов биосинтеза, которые ответственны за включение 7-деазагуанина в ДНК [200]. Такие системы DPD (7-деазapurин в ДНК) могут содержать до 10 компонентов (DpdA-K) [200, 201]. R-M-подобная активность системы DPD была предположена на основе ингибирования трансформации немодифицированных плазмид в клетки *Salmonella montevideo*, несущих кластер *dpd* [200]. Однако активность системы DPD против фаговой инфекции до сих пор не показана, и возможный механизм рестрикции остается невыясненным. Дополнительные компоненты DPD систем включают хеликазы, PdgB-подобную NTPазу и нуклеазу PLD, которые могут быть вовлечены в рестрикцию немодифицированной ДНК. Интересно, что аналогичные кластеры модификации 7-деазагуанина обнаружены в некоторых вирусных геномах (например, в фагах 9g или Cajan), где было показано, что данная модификация защищает фаговую ДНК от широкого спектра эндонуклеаз рестрикции [202, 203].

Системы, связанные с фосфоротиолированием ДНК (РТ). Рассмотренные ранее модификации затрагивали только азотистые основания, но сахаро-фосфатный остов ДНК также может подвергаться модификации. Замена атома кислорода в гидроксильной группе фосфатного остатка на атом серы, называемая фосфоротиолированием, приводит к появлению РТ-связи (фосфоротиоат) в ДНК, которая может быть ассоциирована с различными защитными системами бактерий и архей [204–206]. Эти системы кратко представлены на рис. 6, б.

Фосфоротиолирование (РТ-модификация) происходит в результате активности генов *dndABCDE* (Dnd – фенотип, связанный с деградацией ДНК), которые кодируют цистеиндесульфуразу (DndA), PAPS-редуктазу (DndC),

АТРазу/никирующую эндонуклеазу (DndD) и небольшой белок DndE, который связывается с никированной ДНК. При этом DndB регулирует транскрипцию оперона *dndBCDE* и таким образом определяет долю РТ-модифицированных сайтов в геноме [204, 207–209]. Пока еще определены не все стадии биохимического пути, задействованного в процесс фосфоротиолирования. Однако известно, что цистеин является донором атома серы, который переносится на DndC и затем энергозависимым образом встраивается в ДНК, предварительно никированную DndD [192, 210, 211]. Недавно было показано, что гены *dnd* также могут быть задействованы в РТ-модификации РНК [212]. Считается, что РТ-модификация важна для поддержания редокс-гомеостаза и контроля экспрессии генов [213], но у бактерий модификационный модуль Dnd часто сопровождается кластером генов рестрикции *dndFGH* [214]. *In vitro* активность компонентов DndFGH не была изучена, однако *in vivo* присутствие кластера *dndABCDE–FGH* ингибировало трансформацию немодифицированной ДНК, в то время как экспрессия DndFGH в штамме, не содержащем DndABCE, приводила к расщеплению собственной ДНК клетки [214–216]. Наиболее заметной чертой РТ-модификации, которая довольно сильно отличается от метилирования системами R-M, является тот факт, что модифицируется лишь небольшая доля доступных сайтов, и модификация каждого конкретного участка носит кратковременный характер. Это рождает вопросы о механизмах избегания рестрикции собственной ДНК [217, 218]. Наличие метилирования Dam влияет на распределение РТ-модифицированных сайтов, но не влияет на их общую плотность [219]. В связи с этим было предположено, что специфичность РТ-модификации определяется общей геометрией участка ДНК, а не его последовательностью [219].

РТ-модификация также была показана для архей, у которых функцию рестрикции вместо *dndFGH* выполняет кластер генов *pbeABCD* [205]. Было показано, что *dndCDEA–pbeABCD* из клеток *Haloterrigena jeotgali* обеспечивает противовирусную защиту, и рестрикционная активность зависит от функционально-активного модуля РТ-модификации, что отличается от поведения *dndFGH* [205]. В инфицированных *dndCDEA–pbeABCD* клетках не наблюдалось накопления вирусной ДНК, хотя при этом не было показано и её расщепления. Гены *pbeABCD* могут также обнаруживаться вне контекста *dndCDEA* или вблизи генов метилтрансфераз, что подразумевает возможность обмена модулями между различными защитными системами [205].

Недавно была открыта еще одна основанная на РТ-модификации защитная система — SspABCD-SspE [206]. Гены *sspABCD* не гомологичны генам *dndABCDE*, но они кодируют сходные функциональные домены и выполняют РТ-модификацию ДНК, в то время как SspE служит в качестве рестрикционного компонента, ингибируя фаговую инфекцию. *In vitro* было показано, что SspE обладает активностью НТРазы, которая стимулируется наличием РТ-модифицированных сайтов и неспецифической никазной эндонуклеазной активностью [206]. Отличительной особенностью SspABCD является модификация только одной цепи ДНК внутри непалиндромных участков узнавания.

Описание других стратегий защиты прокариотических клеток от вирусных инфекций, а также обсуждение взаимодействий между различными противовирусными системами будет продолжено во второй главе рукописи.

Финансирование. Выполнение данной работы происходило при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-50560). А.И. также поддержан грантом Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-90160), О.М. поддержана грантом Российского научного фонда (грант № 19-74-00118).

Вклад авторов. А.И. подготовил текст обзорной статьи, А.И. и О.М. подготовили рисунки, К.С. провел редактуру статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Анне Ершовой и Андрею Летарову за критические замечания к отдельным разделам статьи. Иллюстрации были подготовлены при помощи программы BioRender.

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

- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., and Heaphy, S. (2011) Phages in nature, *Bacteriophage*, **1**, 31-45.
- Díaz-Muñoz, S. L., and Koskella, B. (2014) Bacteriophage interactions in natural environments, in *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier, Vol. 89, pp. 135-183.
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., et al. (2019) Bacteriophages in natural and artificial environments, *Pathogens*, **8**, 100.
- Wommack, K. E., and Colwell, R. R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 69-114.
- Parikka, K. J., Le Romancer, M., Wauters, N., and Jacquet, S. (2017) Deciphering the virus-to-prokaryote ratio (VPR): insights into virus-host relationships in a variety of ecosystems, *Biol. Rev.*, **92**, 1081-1100.
- Rodriguez-Valera, F., Martín-Cuadrado, A.-B., Rodriguez-Brito, B., Pasic, L., Thingstad, T. F., et al. (2009) Explaining microbial population genomics through phage predation, *Nat. Preced.*, doi: 10.1038/npre.2009.3489.1.
- Breitbart, M., Bonnain, C., Malki, K., and Sawaya, N. A. (2018) Phage puppet masters of the marine microbial realm, *Nat. Microbiol.*, **3**, 754-766.
- Brüssow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.-D. (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 560-602.
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., and Chen, J. (2019) Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical, *PLoS Pathog.*, **15**, e1007878.
- Lang, A. S., Westbye, A. B., and Beatty, J. T. (2017) The distribution, evolution, and roles of gene transfer agents in prokaryotic genetic exchange, *Annu. Rev. Virol.*, **4**, 87-104.
- Keen, E. C., Bliskovsky, V. V., Malagon, F., Baker, J. D., Prince, J. S., et al. (2017) Novel “superspreader” bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation, *MBio*, **8**, e02115-16.
- 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**, 1-12.
- Szathmáry, E., and Demeter, L. (1987) Group selection of early replicators and the origin of life, *J. Theor. Biol.*, **128**, 463-486.
- Krupovic, M., Dolja, V. V., and Koonin, E. V. (2019) Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 449-458.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Wolf, Y. I. (2017) Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 233-261.
- Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (2000) Who’s your neighbor? New computational approaches for functional genomics, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 609-613.
- Shmakov, S. A., Faure, G., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K. V., and Koonin, E. V. (2019) Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes, *Nat. Protoc.*, **14**, 3013-3031.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S., and Koonin, E. V. (2011) Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems, *J. Bacteriol.*, **193**, 6039-56.
- Oliveira, P. H., Touchon, M., and Rocha, E. P. C. (2014) The interplay of restriction–modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10618-10631.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Krupovic, M. (2020) Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 119-131.
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., et al. (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome, *Science*, **359**, eaar4120.
- Gao, L., Altae-Tran, H., Böhning, F., Makarova, K. S., Segel, M., et al. (2020) Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes, *Science*, **369**, 1077-1084.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2019) Towards functional characterization of archaeal genomic dark matter, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 389-398.

24. Eraslan, G., Avsec, Ž., Gagneur, J., and Theis, F. J. (2019) Deep learning: new computational modelling techniques for genomics, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 389-403.
25. Eitzinger, S., Asif, A., Watters, K. E., Iavarone, A. T., Knott, G. J., et al. (2020) Machine learning predicts new anti-CRISPR proteins, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4698-4708.
26. Gussow, A. B., Park, A. E., Borges, A. L., Shmakov, S. A., Makarova, K. S., et al. (2020) Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families, *Nat. Commun.*, **11**, 1-12.
27. Kronheim, S., Daniel-Ivad, M., Duan, Z., Hwang, S., Wong, A. I., et al. (2018) A chemical defence against phage infection, *Nature*, **564**, 283-286.
28. Fillol-Salom, A., Miguel-Romero, L., Marina, A., Chen, J., and Penadés, J. R. (2020) Beyond the CRISPR-Cas safeguard: PICI-encoded innate immune systems protect bacteria from bacteriophage predation, *Curr. Opin. Microbiol.*, **56**, 52-58.
29. O'Hara, B. J., Barth, Z. K., McKitterick, A. C., and Seed, K. D. (2017) A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome, *PLoS Genet.*, **13**, 1-17.
30. Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015) REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D298-D299.
31. Akarsu, H., Bordes, P., Mansour, M., Bigot, D.-J., Genevaux, P., and Falquet, L. (2019) TASmania: a bacterial toxin-antitoxin systems database, *PLOS Comput. Biol.*, **15**, e1006946.
32. Zhang, F., Zhao, S., Ren, C., Zhu, Y., Zhou, H., et al. (2018) CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions, *Commun. Biol.*, **1**, 1-5.
33. Pourcel, C., Touchon, M., Villeriot, N., Vernadet, J.-P., Couvin, D., et al. (2020) CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D535-D544.
34. Zhang, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, Z., and Xiao, J. (2020) PADS Arsenal: A database of prokaryotic defense systems related genes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D590-D598.
35. Mandler, K., Chen, H., Parks, D. H., Lobb, B., Hug, L. A., and Doxey, A. C. (2019) Annotree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4442-4448.
36. Howard-Varona, C., Lindback, M. M., Bastien, G. E., Solonenko, N., Zayed, A. A., et al. (2020) Phage-specific metabolic reprogramming of virocells, *ISME J.*, **14**, 881-895.
37. Ghosh, S., Hamdan, S. M., Cook, T. E., and Richardson, C. C. (2008) Interactions of *Escherichia coli* thioredoxin, the processivity factor, with bacteriophage T7 DNA polymerase and helicase, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32077-32084.
38. Qimron, U., Marintcheva, B., Tabor, S., and Richardson, C. C. (2006) Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19039-19044.
39. Maynard, N. D., Birch, E. W., Sanghvi, J. C., Chen, L., Gutschow, M. V., and Covert, M. W. (2010) A forward-genetic screen and dynamic analysis of lambda phage host-dependencies reveals an extensive interaction network and a new anti-viral strategy, *PLoS Genet.*, **6**, e1001017.
40. Bohm, K., Porwollik, S., Chu, W., Dover, J. A., Gilcrease, E. B., et al. (2018) Genes affecting progression of bacteriophage P22 infection in *Salmonella* identified by transposon and single gene deletion screens, *Mol. Microbiol.*, **108**, 288-305.
41. Piya, D., Lessor, L., Koehler, B., Stonecipher, A., Cahill, J., and Gill, J. J. (2020) Genome-wide screens reveal *Escherichia coli* genes required for growth of T1-like phage LL5 and V5-like phage LL12, *Sci. Rep.*, **10**, 1-9.
42. Rousset, F., Cui, L., Siouve, E., Becavin, C., Depardieu, F., and Bikard, D. (2018) Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors, *PLoS Genet.*, **14**, e1007749.
43. Kortright, K. E., Chan, B. K., and Turner, P. E. (2020) High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 18670-18679.
44. Mutalik, V. K., Adler, B. A., Rishi, H. S., Piya, D., Zhong, C., et al. (2020) High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli*, *PLoS Biol.*, **18**, e3000877.
45. Luria, S. E., and Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, **28**, 491.
46. Isaev, A., Drobiazko, A., Sierro, N., Gordeeva, J., Yosef, I., et al. (2020) Phage T7 DNA mimic protein Ocr is a potent inhibitor of BREX defence, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 5397-5406.
47. Pinilla-Redondo, R., Shehreen, S., Marino, N. D., Fagerlund, R. D., Brown, C. M., et al. (2020) Discovery of multiple anti-CRISPRs highlights anti-defense gene clustering in mobile genetic elements, *Nat. Commun.*, **11**, 1-11.
48. Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013) Revenge of the phages: defeating bacterial defences, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 675-87.
49. Hwang, S., and Maxwell, K. L. (2019) Meet the anti-CRISPRs: widespread protein inhibitors of CRISPR-Cas systems, *Cris. J.*, **2**, 23-30.
50. Hampton, H. G., Watson, B. N. J., and Fineran, P. C. (2020) The arms race between bacteria and their phage foes, *Nature*, **577**, 327-336.
51. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., and Sauvageau, D. (2016) Host receptors for bacteriophage adsorption, *FEMS Microbiol. Lett.*, **363**, fnw002.
52. Dowah, A. S. A., and Clokie, M. R. J. (2018) Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria, *Biophys. Rev.*, **10**, 535-542.
53. Stone, E., Campbell, K., Grant, I., and McAuliffe, O. (2019) Understanding and exploiting phage-host interactions, *Viruses*, **11**, 567.
54. Dragoš, A., and Kovács, Á. T. (2017) The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix, *Trends Microbiol.*, **25**, 257-266.
55. Hansen, M. F., Svenningsen, S. Lo, Røder, H. L., Middelboe, M., and Burmølle, M. (2019) Big impact of the tiny: bacteriophage-bacteria interactions in biofilms, *Trends Microbiol.*, **27**, 739-752.
56. Abedon, S. T. (2017) Phage "delay" towards enhancing bacterial escape from biofilms: a more comprehensive way of viewing resistance to bacteriophages, *AIMS Microbiol.*, **3**, 186.
57. Fernández, L., Rodríguez, A., and García, P. (2018) Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities, *ISME J.*, **12**, 1171-1179.
58. Henriksen, K., Rørbo, N., Rybtke, M. L., Martinet, M. G., Tolker-Nielsen, T., et al. (2019) *P. aeruginosa* flow-cell biofilms are enhanced by repeated phage treatments but can be eradicated by phage-ciprofloxacin combination, *Pathog. Dis.*, **77**, ftz011.
59. Hosseini-doust, Z., Tufenkji, N., and van de Ven, T. G. M. (2013) Formation of biofilms under phage predation: con-

- siderations concerning a biofilm increase, *Biofouling*, **29**, 457-468.
60. Bull, J. J., Christensen, K. A., Scott, C., Jack, B. R., Crandall, C. J., and Krone, S. M. (2018) Phage-bacterial dynamics with spatial structure: self organization around phage sinks can promote increased cell densities, *Antibiotics*, **7**, 8.
 61. Tan, D., Dahl, A., and Middelboe, M. (2015) Vibriophages differentially influence biofilm formation by *Vibrio anguillarum* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 4489-4497.
 62. Vidakovic, L., Singh, P. K., Hartmann, R., Nadell, C. D., and Drescher, K. (2018) Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection, *Nat. Microbiol.*, **3**, 26-31.
 63. Scanlan, P. D., and Buckling, A. (2012) Co-evolution with lytic phage selects for the mucoid phenotype of *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *ISME J.*, **6**, 1148-1158.
 64. Wilkinson, B. J., and Holmes, K. M. (1979) *Staphylococcus aureus* cell surface: capsule as a barrier to bacteriophage adsorption, *Infect. Immun.*, **23**, 549-552.
 65. Kim, M. S., Kim, Y. D., Hong, S. S., Park, K., Ko, K. S., and Myung, H. (2015) Phage-encoded colanic acid-degrading enzyme permits lytic phage infection of a capsule-forming resistant mutant *Escherichia coli* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 900-909.
 66. Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., et al. (2018) *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection, *J. Bacteriol.*, **200**, 1-9.
 67. Manning, A. J., and Kuehn, M. J. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense, *BMC Microbiol.*, **11**, 258.
 68. Tzipilevich, E., Habusha, M., and Ben-Yehuda, S. (2017) Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors, *Cell*, **168**, 186-199.e12.
 69. Betts, A., Gifford, D. R., MacLean, R. C., and King, K. C. (2016) Parasite diversity drives rapid host dynamics and evolution of resistance in a bacteria-phage system, *Evolution (N.Y.)*, **70**, 969-978.
 70. Braun, V. (2009) FhuA (TonA), the career of a protein, *J. Bacteriol.*, **191**, 3431-3436.
 71. Chatterjee, S., and Rothenberg, E. (2012) Interaction of bacteriophage λ with its *E. coli* receptor, LamB, *Viruses*, **4**, 3162-3178.
 72. Kulikov, E. E., Golomidova, A. K., Prokhorov, N. S., Ivanov, P. A., and Letarov, A. V. (2019) High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies, *Sci. Rep.*, **9**, 1-10.
 73. Moller, A. G., Lindsay, J. A., and Read, T. D. (2019) Determinants of phage host range in *Staphylococcus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e00209-19.
 74. Wright, R. C. T., Friman, V.-P., Smith, M. C. M., and Brockhurst, M. A. (2018) Cross-resistance is modular in bacteria-phage interactions, *PLoS Biol.*, **16**, e2006057.
 75. Christen, M., Beusch, C., Bösch, Y., Cerletti, D., Flores-Tinoco, C. E., et al. (2016) Quantitative selection analysis of bacteriophage ϕ CbK susceptibility in *Caulobacter crescentus*, *J. Mol. Biol.*, **428**, 419-430.
 76. Bikard, D., and Marraffini, L. A. (2012) Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages, *Curr. Opin. Immunol.*, **24**, 15-20.
 77. Van Houte, S., Buckling, A., and Westra, E. R. (2016) Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 745-763.
 78. Riede, I., and Eschbach, M. L. (1986) Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **205**, 241-245.
 79. Harvey, H., Bondy-Denomy, J., Marquis, H., Sztanko, K. M., Davidson, A. R., and Burrows, L. L. (2018) *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation, *Nat. Microbiol.*, **3**, 47-52.
 80. Kim, M., and Ryu, S. (2012) Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glycosylation of O-antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Mol. Microbiol.*, **86**, 411-425.
 81. Fallico, V., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and McAuliffe, O. (2011) Genetic response to bacteriophage infection in *Lactococcus lactis* reveals a four-strand approach involving induction of membrane stress proteins, D-alanylation of the cell wall, maintenance of proton motive force, and energy conservation, *J. Virol.*, **85**, 12032-12042.
 82. Power, P. M., Sweetman, W. A., Gallacher, N. J., Woodhall, M. R., Kumar, G. A., et al. (2009) Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*, *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 216-228.
 83. Turkington, C. J. R., Morozov, A., Clokie, M. R. J., and Bayliss, C. D. (2019) Phage-resistant phase-variant subpopulations mediate herd immunity against bacteriophage invasion of bacterial meta-populations, *Front. Microbiol.*, **10**, 1473.
 84. Seed, K. D., Faruque, S. M., Mekalanos, J. J., Calderwood, S. B., Qadri, F., and Camilli, A. (2012) Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1, *PLoS Pathog*, **8**, e1002917.
 85. Komano, T. (1999) Shufflons: multiple inversion systems and integrons, *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 171-191.
 86. Brouwer, M. S. M., Jurburg, S. D., Harders, F., Kant, A., Mevius, D. J., et al. (2019) The shufflon of IncI1 plasmids is rearranged constantly during different growth conditions, *Plasmid*, **102**, 51-55.
 87. Porter, N. T., Hryckowian, A. J., Merrill, B. D., Fuentes, J. J., Gardner, J. O., et al. (2020) Phase-variable capsular polysaccharides and lipoproteins modify bacteriophage susceptibility in *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1170-1181.
 88. Quemina, E. R. J., and Quax, T. E. F. (2015) Archaeal viruses at the cell envelope: entry and egress, *Front. Microbiol.*, **6**, 552.
 89. Hartman, R., Eilers, B. J., Bollschweiler, D., Munson-McGee, J. H., Engelhardt, H., et al. (2019) The molecular mechanism of cellular attachment for an archaeal virus, *Structure*, **27**, 1634-1646.
 90. Deng, L., He, F., Bhoobalan-Chitty, Y., Martinez-Alvarez, L., Guo, Y., and Peng, X. (2014) Unveiling cell surface and type IV secretion proteins responsible for archaeal rudivirus entry, *J. Virol.*, **88**, 10264-10268.
 91. Asheshov, I. N., Strelitz, F., and Hall, E. A. (1949) Antibiotics active against bacterial viruses, *Br. J. Exp. Pathol.*, **30**, 175.
 92. Cohen, S. S. (1949) Growth requirements of bacterial viruses, *Bacteriol. Rev.*, **13**, 1.
 93. Putnam, F. W. (1953) Bacteriophages: nature and reproduction, in *Advances in Protein Chemistry*, Elsevier, Vol. 8, pp. 175-284.
 94. Neter, E. (1942) Effects of tyrothricin and actinomycin A upon bacteriophage and bacterial toxins and toxin-like substances, *J. Bacteriol.*, **43**.
 95. Jones, D. (1945) The effect of antibiotic substances upon bacteriophage, *J. Bacteriol.*, **50**, 341.
 96. Knezevic, P., and Sabo, V. A. (2019) Combining bacteriophages with other antibacterial agents to combat bacteria, in *Phage Therapy: A Practical Approach*, Springer, pp. 257-293.
 97. Morita, J., Tanaka, A., Komano, T., and Oki, T. (1979) Inactivation of phage ϕ X174 by anthracycline antibiotics, aclacinomycin A, doxorubicin and daunorubicin, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2629-2631.

98. Duan, Z. (2016) *Identification and Characterization of Novel Anti-Phage Compounds Using a High Throughput Approach*, Master Thesis, University of Toronto.
99. Rivera-Serrano, E. E., Gizzi, A. S., Arnold, J. J., Grove, T. L., Almo, S. C., and Cameron, C. E. (2020) Viperin reveals its true function, *Annu. Rev. Virol.*, **7**, 421-446.
100. Gizzi, A. S., Grove, T. L., Arnold, J. J., Jose, J., Jangra, R. K., et al. (2018) A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome, *Nature*, **558**, 610-614.
101. Fenwick, M. K., Li, Y., Cresswell, P., Modis, Y., and Ealick, S. E. (2017) Structural studies of viperin, an antiviral radical SAM enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 6806-6811.
102. Bernheim, A., Millman, A., Ofir, G., Meitav, G., Avraham, C., et al. (2021) Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules, *Nature*, **589**, 120-124.
103. Ng, W.-L., and Bassler, B. L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures, *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 197-222.
104. Moreau, P., Diggle, S. P., and Friman, V. (2017) Bacterial cell-to-cell signaling promotes the evolution of resistance to parasitic bacteriophages, *Ecol. Evol.*, **7**, 1936-1941.
105. Srivastava, D., and Waters, C. M. (2012) A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP, *J. Bacteriol.*, **194**, 4485-4493.
106. Høyland-Kroghsbo, N. M., Mærkedahl, R. B., and Svenningsen, S. Lo (2013) A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism, *MBio*, **4**, e00362-12.
107. Tan, D., Svenningsen, S. Lo, and Middelboe, M. (2015) Quorum sensing determines the choice of antiphage defense strategy in *Vibrio anguillarum*, *MBio*, **6**, 1-10.
108. Castillo, D., Rørbo, N., Jørgensen, J., Lange, J., Tan, D., et al. (2019) Phage defense mechanisms and their genomic and phenotypic implications in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **95**, fiz004.
109. Patterson, A. G., Jackson, S. A., Taylor, C., Evans, G. B., Salmond, G. P. C., et al. (2016) Quorum sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems, *Mol. Cell*, **64**, 1102-1108.
110. Høyland-Kroghsbo, N. M., Paczkowski, J., Mukherjee, S., Broniewski, J., Westra, E., et al. (2017) Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 131-135.
111. Silpe, J. E., and Bassler, B. L. (2019) A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision, *Cell*, **176**, 268-280.
112. Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., et al. (2017) Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions, *Nature*, **541**, 488-493.
113. Stokar-Avihail, A., Tal, N., Erez, Z., Lopatina, A., and Sorek, R. (2019) Widespread utilization of peptide communication in phages infecting soil and pathogenic bacteria, *Cell Host Microbe*, **25**, 746-755.
114. Bernard, C., Li, Y., Lopez, P., and Bapteste, E. (2020) Beyond arbitrium: identification of a second communication system in *Bacillus* phage phi3T that may regulate host defense mechanisms, *ISME J.*, **15**, 545-549, doi: 10.1038/s41396-020-00795-9.
115. Grayson, P., and Molineux, I. J. (2007) Is phage DNA 'injected' into cells – biologists and physicists can agree, *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 401-409.
116. Labrie, S. J., Samson, J. E., and Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 317-327.
117. Abedon, S. T. (2015) Bacteriophage secondary infection, *Virol. Sin.*, **30**, 3-10.
118. Bebeacua, C., Lorenzo Fajardo, J. C., Blangy, S., Spinelli, S., Bollmann, S., et al. (2013) X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target, *Mol. Microbiol.*, **89**, 152-65.
119. Ali, Y., Koberg, S., Heßner, S., Sun, X., Rabe, B., et al. (2014) Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type, *Front. Microbiol.*, **5**, 98.
120. Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., and Maxwell, K. L. (2012) The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein, *J. Bacteriol.*, **194**, 5012-5019.
121. Cumby, N., Reimer, K., Mengin-Lecreulx, D., Davidson, A. R., and Maxwell, K. L. (2015) The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of *E. coli* phage HK 97, *Mol. Microbiol.*, **96**, 437-447.
122. Lu, M. J., and Henning, U. (1994) Superinfection exclusion by T-even-type coliphages, *Trends Microbiol.*, **2**, 137-9.
123. Lu, M. J., and Henning, U. (1989) The immunity (imm) gene of *Escherichia coli* bacteriophage T4, *J. Virol.*, **63**, 3472-3478.
124. Ko, C., and Hatfull, G. F. (2018) Mycobacteriophage Fruitloop gp52 inactivates Wag31 (DivIVA) to prevent heterotypic superinfection, *Mol. Microbiol.*, **108**, 443-460.
125. Mahony, J., McGrath, S., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D. (2008) Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6206-6215.
126. Hofer, B., Ruge, M., and Dreiseikelmann, B. (1995) The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product, *J. Bacteriol.*, **177**, 3080-3086.
127. Nesper, J., Blaß, J., Fountoulakis, M., and Reidl, J. (1999) Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion, and integration, *J. Bacteriol.*, **181**, 2902-2913.
128. Kliem, M., and Dreiseikelmann, B. (1989) The superimmunity gene sim of bacteriophage P1 causes superinfection exclusion, *Virology*, **171**, 350-355.
129. Carballo-Ontiveros, M. A., Cazares, A., Vinuesa, P., Kameyama, L., and Guarneros, G. (2020) The concerted action of two B3-like prophage genes exclude superinfecting bacteriophages by blocking DNA entry into *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Virol.*, **94**, e00953-20, doi: 10.1128/JVI.00953-20.
130. Domingo-Calap, P., Mora-Quilis, L., and Sanjuán, R. (2020) Social bacteriophages, *Microorganisms*, **8**, 1-10.
131. Ragunathan, P. T., and Vanderpool, C. K. (2019) Cryptic-prophage-encoded small protein DicB protects *Escherichia coli* from phage infection by inhibiting inner membrane receptor proteins, *J. Bacteriol.*, **201**, e00475-19.
132. Dillingham, M. S., and Kowalczykowski, S. C. (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 642-671.
133. Cheng, K., Wilkinson, M., Chaban, Y., and Wigley, D. B. (2020) A conformational switch in response to Chi converts RecBCD from phage destruction to DNA repair, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 71-77.
134. Raleigh, E. A., and Brooks, J. E. (1998) Restriction modification systems: where they are and what they do, in *Bacterial Genomes*, Springer, doi: 10.1007/978-1-4615-6369-3_8.
135. Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., and Murray, N. E. (2014) Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3-19.

136. Bertani, G., and Weigle, J. J. (1953) Host controlled variation in bacterial viruses, *J. Bacteriol.*, **65**, 113.
137. Luria, S. E. (1953) Host-induced modifications of viruses, in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 18, pp. 237-244.
138. Berg, P., and Mertz, J. E. (2010) Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology, *Genetics*, **184**, 9-17.
139. Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., et al. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1805-12.
140. Bower, E. K. M., Cooper, L. P., Roberts, G. A., White, J. H., Luyten, Y., et al. (2018) A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction–modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction–modification enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 9067-9080.
141. Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., and Wende, W. (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 685.
142. Pingoud, A., Wilson, G. G., and Wende, W. (2014) Type II restriction endonucleases – a historical perspective and more, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7489-7527.
143. Nelson, M., Raschke, E., and McClelland, M. (1993) Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3139.
144. Morgan, R. D., Bhatia, T. K., Lovasco, L., and Davis, T. B. (2008) MmI: a minimal Type II restriction–modification system that only modifies one DNA strand for host protection, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6558-6570.
145. Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimauskas, S., and Butkus, V. (1992) Purification and properties of the Eco57I restriction endonuclease and methylase – prototypes of a new class (type IV), *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6043-6049.
146. Sorokin, V., Severinov, K., and Gelfand, M. S. (2009) Systematic prediction of control proteins and their DNA binding sites, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 441-451.
147. Klimuk, E., Bogdanova, E., Nagornykh, M., Rodic, A., Djordjevic, M., et al. (2018) Controller protein of restriction–modification system Kpn2I affects transcription of its gene by acting as a transcription elongation roadblock, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 10810-10826.
148. Zakharova, M., Minakhin, L., Solonin, A., and Severinov, K. (2004) Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA, *J. Mol. Biol.*, **335**, 103-111.
149. Murray, N. E. (2000) Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 412-434.
150. Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., and Wilson, G. G. (2014) Type I restriction enzymes and their relatives, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 20-44.
151. Gao, Y., Cao, D., Zhu, J., Feng, H., Luo, X., et al. (2020) Structural insights into assembly, operation and inhibition of a type I restriction–modification system, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1107-1118.
152. Neaves, K. J., Cooper, L. P., White, J. H., Carnally, S. M., Dryden, D. T. F., et al. (2009) Atomic force microscopy of the EcoKI Type I DNA restriction enzyme bound to DNA shows enzyme dimerization and DNA looping, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 2053-2063.
153. Bianco, P. R., and Hurley, E. M. (2005) The type I restriction endonuclease EcoRI24I, couples ATP hydrolysis to bidirectional DNA translocation, *J. Mol. Biol.*, **352**, 837-859.
154. Janscak, P., MacWilliams, M. P., Sandmeier, U., Nagaraja, V., and Bickle, T. A. (1999) DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes, *EMBO J.*, **18**, 2638-2647.
155. Studier, F. W., and Bandyopadhyay, P. K. (1988) Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4677-4681.
156. Smith, R. M., Diffin, F. M., Savery, N. J., Josephsen, J., and Szczelkun, M. D. (2009) DNA cleavage and methylation specificity of the single polypeptide restriction–modification enzyme LlaGI, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7206-7218.
157. Chand, M. K., Carle, V., Anuvind, K. G., and Saikrishnan, K. (2020) DNA-mediated coupling of ATPase, translocase and nuclease activities of a Type ISP restriction–modification enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 2594-2603.
158. Makovets, S., Titheradge, A. J. B., and Murray, N. E. (1998) ClpX and ClpP are essential for the efficient acquisition of genes specifying type IA and IB restriction systems, *Mol. Microbiol.*, **28**, 25-35.
159. Simons, M., Diffin, F. M., and Szczelkun, M. D. (2014) ClpXP protease targets long-lived DNA translocation states of a helicase-like motor to cause restriction alleviation, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12082-12091.
160. Dybvig, K., Sitaraman, R., and French, C. T. (1998) A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13923-13928.
161. Rao, D. N., Dryden, D. T. F., and Bheemanai, S. (2014) Type III restriction–modification enzymes: a historical perspective, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 45-55.
162. Butterer, A., Pernstich, C., Smith, R. M., Sobott, F., Szczelkun, M. D., and Toth, J. (2014) Type III restriction endonucleases are heterotrimeric: comprising one helicase-nuclease subunit and a dimeric methyltransferase that binds only one specific DNA, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5139-5150.
163. Gupta, Y. K., Chan, S.-H., Xu, S., and Aggarwal, A. K. (2015) Structural basis of asymmetric DNA methylation and ATP-triggered long-range diffusion by EcoP15I, *Nat. Commun.*, **6**, 1-10.
164. Janscak, P., Sandmeier, U., Szczelkun, M. D., and Bickle, T. A. (2001) Subunit assembly and mode of DNA cleavage of the type III restriction endonucleases EcoPII and EcoP15I, *J. Mol. Biol.*, **306**, 417-431.
165. Van Aelst, K., Tyth, J., Ramanathan, S. P., Schwarz, F. W., Seidel, R., and Szczelkun, M. D. (2010) Type III restriction enzymes cleave DNA by long-range interaction between sites in both head-to-head and tail-to-tail inverted repeat, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 9123-9128.
166. Schwarz, F. W., Tóth, J., van Aelst, K., Cui, G., Clausing, S., et al. (2013) The helicase-like domains of type III restriction enzymes trigger long-range diffusion along DNA, *Science*, **340**, 353-356.
167. Ahmad, I., Kulkarni, M., Gopinath, A., and Saikrishnan, K. (2018) Single-site DNA cleavage by Type III restriction endonuclease requires a site-bound enzyme and a trans-acting enzyme that are ATPase-activated, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 6229-6237.
168. Srikhanta, Y. N., Fox, K. L., and Jennings, M. P. (2010) The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 196-206.
169. Weigle, P., and Raleigh, E. A. (2016) Biosynthesis and function of modified bases in bacteria and their viruses, *Chem. Rev.*, **116**, 12655-12687.
170. Tock, M. R., and Dryden, D. T. (2005) The biology of restriction and anti-restriction, *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 466-472.
171. Loenen, W. A. M., and Raleigh, E. A. (2014) The other face of restriction: modification-dependent enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 56-69.

172. Czapinska, H., Kowalska, M., Zagorskaitė, E., Manakova, E., Slyvka, A., et al. (2018) Activity and structure of EcoK_{McrA}, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 9829-9841.
173. Siwek, W., Czapinska, H., Bochtler, M., Bujnicki, J. M., and Skowronek, K. (2012) Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R. DpnI, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7563-7572.
174. Liu, G., Ou, H.-Y., Wang, T., Li, L., Tan, H., et al. (2010) Cleavage of phosphorothioated DNA and methylated DNA by the type IV restriction endonuclease ScoMcrA, *PLoS Genet.*, **6**, e1001253.
175. Sutherland, E., Coe, L., and Raleigh, E. A. (1992) McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease, *J. Mol. Biol.*, **225**, 327-348.
176. Xu, S., Corvaglia, A. R., Chan, S.-H., Zheng, Y., and Linder, P. (2011) A type IV modification-dependent restriction enzyme SauUSI from *Staphylococcus aureus* subsp. aureus USA300, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5597-5610.
177. Vasu, K., and Nagaraja, V. (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **77**, 53-72.
178. Murphy, J., Mahony, J., Ainsworth, S., Nauta, A., and van Sinderen, D. (2013) Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 7547-7555.
179. Adhikari, S., and Curtis, P. D. (2016) DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 575-591.
180. Kobayashi, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3742-3756.
181. Ershova, A. S., Rusinov, I. S., Spirin, S. A., Karyagina, A. S., and Alexeevski, A. V. (2015) Role of restriction-modification systems in prokaryotic evolution and ecology, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1373-1386.
182. Seib, K. L., Srikhanta, Y. N., Atack, J. M., and Jennings, M. P. (2020) Epigenetic regulation of virulence and immunoevasion by phase-variable restriction-modification systems in bacterial pathogens, *Annu. Rev. Microbiol.*, **74**, 655-671.
183. Dimitriu, T., Szczelkun, M. D., and Westra, E. R. (2020) Evolutionary ecology and interplay of prokaryotic innate and adaptive immune systems, *Curr. Biol.*, **30**, R1189-R1202.
184. Lomovskaia, N. D., Mkrtumian, N. M., and Gostimskaya, N. L. (1970) Isolation and characterization of the actinophage of *Streptomyces coelicolor*, *Genetika*, **6**, 135.
185. Chinenova, T. A., Mkrtumian, N. M., and Lomovskaia, N. D. (1982) Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Genetika*, **18**, 1945-1952.
186. Chater, K. F. (1986) *Streptomyces* phages and their applications to *Streptomyces* genetics, in *The Bacteria*, Academic Press Orlando, vol. 9, pp. 119-158.
187. Bedford, D. J., Laity, C., and Buttner, M. J. (1995) Two genes involved in the phase-variable phi C31 resistance mechanism of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.*, **177**, 4681-9.
188. Laity, C., Chater, K. F., Lewis, C. G., and Buttner, M. J. (1993) Genetic analysis of the phi C31-specific phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.*, **7**, 329-36.
189. Sumbly, P., and Smith, M. C. M. (2002) Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.*, **44**, 489-500.
190. Hoskisson, P. A., Sumbly, P., and Smith, M. C. M. (2015) The phage growth limitation system in *Streptomyces coelicolor* A(3)2 is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity, *Virology*, **477**, 100-109.
191. Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., et al. (2015) BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes, *EMBO J.*, **34**, 169-183.
192. Pu, T., Mei, Z., Zhang, W., Liang, W., Zhou, X., et al. (2020) An *in vitro* DNA phosphorothioate modification reaction, *Mol. Microbiol.*, **113**, 452-463.
193. Gordeeva, J., Morozova, N., Sierro, N., Isaev, A., Sinkunas, T., et al. (2019) BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 253-265.
194. LeGault, K., Hays, S. G., Angermeyer, A., McKitterick, A. C., Johura, F., et al. (2020) Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern virus-pathogen conflicts, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.16.423150.
195. Hui, W., Zhang, W., Kwok, L.-Y., Zhang, H., Kong, J., and Sun, T. (2019) Identification and functional analysis of the pglX gene of *Lactobacillus casei* Zhang bacteriophage exclusive (BREX) system, *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM-01001.
196. Atanasiu, C., Su, T. J., Sturrock, S. S., and Dryden, D. T. F. (2002) Interaction of the ocr gene 0.3 protein of bacteriophage T7 with Eco KI restriction/modification enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3936-3944.
197. Bandyopadhyay, P. K., Studier, F. W., Hamilton, D. L., and Yuan, R. (1985) Inhibition of the type I restriction-modification enzymes EcoB and EcoK by the gene 0.3 protein of bacteriophage T7, *J. Mol. Biol.*, **182**, 567-578.
198. Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., et al. (2018) DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities, *Nat. Microbiol.*, **3**, 90-98.
199. Mahankali, M., Alter, G., and Gomez-Cambronero, J. (2015) Mechanism of enzymatic reaction and protein-protein interactions of PLD from a 3D structural model, *Cell. Signal.*, **27**, 69-81.
200. Thiaville, J. J., Kellner, S. M., Yuan, Y., Hutinet, G., Thiaville, P. C., et al. (2016) Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1452-E1459.
201. Iyer, L. M., Zhang, D., Maxwell Burroughs, A., and Aravind, L. (2013) Computational identification of novel biochemical systems involved in oxidation, glycosylation and other complex modifications of bases in DNA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7635-7655.
202. Hutinet, G., Kot, W., Cui, L., Hillebrand, R., Balamkundu, S., et al. (2019) 7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems, *Nat. Commun.*, **10**, 1-12.
203. Kot, W., Olsen, N. S., Nielsen, T. K., Hutinet, G., de Crécy-Lagard, V., et al. (2020) Detection of preQ0 deazaguanine modifications in bacteriophage CAjan DNA using Nanopore sequencing reveals same hypermodification at two distinct DNA motifs, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 10383-10396.
204. Wang, L., Jiang, S., Deng, Z., Dedon, P. C., and Chen, S. (2019) DNA phosphorothioate modification – a new multi-functional epigenetic system in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **43**, 109-122.
205. Xiong, L., Liu, S., Chen, S., Xiao, Y., Zhu, B., et al. (2019) A new type of DNA phosphorothioation-based antiviral system in archaea, *Nat. Commun.*, **10**, 1-11.
206. Xiong, X., Wu, G., Wei, Y., Liu, L., Zhang, Y., et al. (2020) SspABCD-SspE is a phosphorothioation-sensing bacterial defence system with broad anti-phage activities, *Nat. Microbiol.*, **5**, 917-928.
207. Zhou, X., He, X., Liang, J., Li, A., Xu, T., et al. (2005) A novel DNA modification by sulphur, *Mol. Microbiol.*, **57**, 1428-1438.

208. Wang, L., Chen, S., Xu, T., Taghizadeh, K., Wishnok, J. S., et al. (2007) Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 709-710.
209. He, W., Huang, T., Tang, Y., Liu, Y., Wu, X., et al. (2015) Regulation of DNA phosphorothioate modification in *Salmonella enterica* by DndB, *Sci. Rep.*, **5**, 12368.
210. You, D., Wang, L., Yao, F., Zhou, X., and Deng, Z. (2007) A Novel DNA Modification by sulfur: DndA is a NifS-like cysteine desulfurase capable of assembling DndC as an iron-sulfur cluster protein in *Streptomyces lividans*, *Biochemistry*, **46**, 6126-6133.
211. Yao, F., Xu, T., Zhou, X., Deng, Z., and You, D. (2009) Functional analysis of *spfD* gene involved in DNA phosphorothioation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *FEBS Lett.*, **583**, 729-733.
212. Wu, Y., Tang, Y., Dong, X., Zheng, Y. Y., Haruehanroengra, P., et al. (2020) RNA phosphorothioate modification in prokaryotes and eukaryotes, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1301-1305.
213. Tong, T., Chen, S., Wang, L., Tang, Y., Ryu, J. Y., et al. (2018) Occurrence, evolution, and functions of DNA phosphorothioate epigenetics in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **115**, E2988-E2996.
214. Xu, T., Yao, F., Zhou, X., Deng, Z., and You, D. (2010) A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7133-41.
215. Cao, B., Cheng, Q., Gu, C., Yao, F., DeMott, M. S., et al. (2014) Pathological phenotypes and *in vivo* DNA cleavage by unrestrained activity of a phosphorothioate-based restriction system in *Salmonella*, *Mol. Microbiol.*, **93**, 776-785.
216. Gan, R., Wu, X., He, W., Liu, Z., Wu, S., et al. (2014) DNA phosphorothioate modifications influence the global transcriptional response and protect DNA from double-stranded breaks, *Sci. Rep.*, **4**, 6642.
217. Cao, B., Chen, C., DeMott, M. S., Cheng, Q., Clark, T. A., et al. (2014) Genomic mapping of phosphorothioates reveals partial modification of short consensus sequences, *Nat. Commun.*, **5**, 1-13.
218. Li, J., Chen, Y., Zheng, T., Kong, L., Zhu, S., et al. (2019) Quantitative mapping of DNA phosphorothioate reveals phosphorothioate heterogeneity of low modification frequency, *PLoS Genet.*, **15**, e1008026.
219. Wu, X., Cao, B., Aquino, P., Chiu, T.-P., Chen, C., et al. (2020) Epigenetic competition reveals density-dependent regulation and target site plasticity of phosphorothioate epigenetics in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 14322-14330, doi: 10.1073/pnas.2002933117.

MICROBIAL ARSENAL OF ANTIVIRAL DEFENSES – PART I

Review

A. B. Isaev^{1*}, O. S. Musharova^{1,2}, and K. V. Severinov^{1,3*}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Moscow, Russia; E-mail: teft18@gmail.com

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; E-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Bacteriophages or phages are viruses that infect bacterial cells (for the scope of this review we will also consider viruses that infect Archaea). Constant threat of phage infection is a major force that shapes evolution of the microbial genomes. To withstand infection, bacteria had evolved numerous strategies to avoid recognition by phages or to directly interfere with phage propagation inside the cell. Classical molecular biology and genetic engineering have been deeply intertwined with the study of phages and host defenses. Nowadays, owing to the rise of phage therapy, broad application of CRISPR-Cas technologies, and development of bioinformatics approaches that facilitate discovery of new systems, phage biology experiences a revival. This review describes variety of strategies employed by microbes to counter phage infection, with a focus on novel systems discovered in recent years. First chapter covers defense associated with cell surface, role of small molecules, and innate immunity systems relying on DNA modification.

Keywords: bacteriophages, phage-host interactions, antiviral defence, immunity systems, CRISPR-Cas, restriction-modification, BREX, DISARM, Phosphorothioate, Dnd systems

УДК 577.2

КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА СТРЕСС В ПАНОРАМНОЙ ПРОТЕОМИКЕ: КОНТРОЛЬ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

© 2021 И.Т. Габдрахманов¹, М.В. Горшков^{2,3}, И.А. Тарасова^{3*}

¹ Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе
ФГБУН Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова РАН;
119334 Москва, Россия; электронная почта: iatarasova@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.08.2020

После доработки 03.11.2020

Принята к публикации 01.12.2020

Одной из основных задач количественной протеомики является определение молекулярных изменений на уровне белков в клеточном ответе на стресс. При этом в основе биоинформатической обработки получаемых экспериментальных данных лежит статистический анализ, в котором многократно тестируется гипотеза о равенстве концентраций белков в стрессе относительно нормы. Возникает классическая проблема множественных сравнений, когда повышается вероятность получения ложноположительных результатов. На сегодняшний день известно множество подходов для решения этой проблемы. Однако их применение с исторически принятыми фиксированными порогами статистической значимости может приводить к потере потенциально ценной биологической информации. Используя протеомные данные, полученные ранее для модельных образцов дрожжей, содержащих белки в известных концентрациях, а также данные для биологических моделей раннего и позднего ответа клеток на стресс, были исследованы распределения ложноположительных и ложноотрицательных результатов в зависимости от значений кратных изменений концентраций и порога статистической значимости. На основе анализа плотности распределения точек на диаграммах рассеяния, метода Бенджамини–Хохберга и анализа обогащений генов онтологий предложен наглядный протокол оптимизации статистического порога и отбора дифференциально регулированных белков, который будет полезен исследователям, работающим в области количественного анализа протеомных данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеомика, биоинформатика, клеточный ответ, масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S0320972521030088

ВВЕДЕНИЕ

В современных протеомных исследованиях широкое распространение получил так называемый метод протеомики «снизу-вверх» («bottom-up proteomics»), в основе которого лежит использование тандемной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-МС/МС) [1]. В таком эксперименте цельноклеточные или субклеточные белковые фракции ферментативно расщеп-

ляются на пептиды, которые затем хроматографически разделяются и переводятся из жидкой фазы в газовую с помощью источника ионизации. После ионизации аналит попадает в масс-спектрометр, где измеряются массы пептидов, а также осуществляется их фрагментация. Благодаря спектрам фрагментации становится возможным восстановить первичную структуру пептидов, соотнести их с последовательностями белков и таким образом идентифицировать белковый состав образца [2].

Идентификация пептидов осуществляется с использованием так называемых протеомных поисковых машин (proteomic search engines) – специальных программ, основной задачей которых является сопоставление экспериментальных и теоретических спектров фрагментации пептидов в пределах заданной точности измерений массы. Для заданного правила ферментативного гидролиза из баз данных белков автоматически создаются списки теоретически возможных пептидов, для каждого из которых рас-

Принятые сокращения: ГО – геномные онтологии; FC – кратное изменение концентрации белка (англ. fold change); fdr – доля ложно положительных результатов (англ. false discovery rate); MBR – выравнивание хромато-масс-спектрометрических данных по времени удерживания и массе пептида между экспериментами (англ. match-between-runs); NSAF – нормализованные спектральные интенсивности белков (англ. normalized spectral abundance factor); SC – подсчет спектров фрагментации на белок (англ. spectral count); SI – нормализованный спектральный индекс (англ. spectral index normalized).

* Адресат для корреспонденции.

считываются массы пептида и их теоретически возможных фрагментов. Каждое совпадение экспериментального и теоретического спектра (пептид-спектральное совпадение, peptide-spectrum match, PSM) характеризуется параметрами, определяющими степень доверия такому событию. На этапе последующей обработки результатов поиска с помощью программного обеспечения осуществляется контроль уровня ложноположительных идентификаций и сборка белков из идентифицированных пептидов [3].

В количественной протеомике ставится цель: определить дифференциально регулированные белки при сравнении нескольких групп образцов [4]. Методы количественной протеомики делят на две группы. В первую группу входят так называемые безметочные методы, в основе которых лежит либо подсчёт числа спектральных идентификаций на белок, либо анализ хроматографических интенсивностей пептидов. Вторую группу составляют методы, в которых аминокислоты пептидов или белков метят изотопными метками. Главное отличие методов второй группы заключается в том, что они позволяют делать мультиплексный эксперимент, т.е. смешивать в одной пробе образцы с разными метками. Последнее позволяет минимизировать время анализа и повысить техническую воспроизводимость количественных экспериментов и, соответственно, получить более точные полуколичественные оценки.

С тех пор как была показана линейная зависимость между числом спектральных идентификаций и концентрацией белка в образце, этот параметр (т.е. число спектров фрагментации на белок) используется в качестве простой количественной оценки [3]. Это наблюдение дало начало целой серии методов, основанных на подсчёте спектров, которые различаются между собой способами нормирования [5–7]. Например, в методе нормализованных спектральных интенсивностей белков (Normalized Spectral Abundance Factor, NSAF) количественный индекс представляет собой отношение числа пептид-спектральных совпадений (Spectral Count, SC) на белок к его длине L , которое затем нормализуется на сумму значений SC/L для всех белков, идентифицированных в сложной смеси [6].

$$NSAF = \left(\frac{SC}{L}\right)_k \frac{1}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{SC}{L}\right)_i}$$

Другой метод, известный как нормализованный спектральный индекс (Spectral Index Normalized, SI), сочетает в себе три параметра: число уникальных пептидов на белок, число

спектров фрагментации на пептид и суммарную интенсивность ионов-фрагментов, совпавших с теоретическими фрагментами [7]:

$$SI = \sum_{k=1}^{pn} \left(\sum_{j=1}^{sc} i_j \right),$$

где i_j – интенсивность пика j -го фрагмента, SC – число пептид-спектральных совпадений на пептид k , а pn – число пептидов, идентифицированных для данного белка. Чтобы рассчитать относительное содержание белка в образце, значения SI нормализуют по длине белка L и сумме SI всех идентифицированных белков.

$$SI_N = \frac{SI}{n} \frac{1}{L} \frac{1}{\sum_{i=1}^n SI_i}$$

Методы, основанные на подсчёте спектров, до сих пор являются одними из наиболее распространённых подходов в количественном анализе белков.

Наиболее серьёзным недостатком программных конвейеров, в которых используется подсчёт спектров фрагментации, является неудовлетворительная воспроизводимость результатов идентификации пептидов и белков между экспериментами. Основной причиной является плохое покрытие белковой последовательности идентифицированными пептидами, что связано со стохастической природой масс-спектрометрических данных. Так, в различных наборах данных 20–50% всех белков могут быть идентифицированы лишь по одному пептиду, причём в разных экспериментах это могут быть разные белки [8]. Возникает проблема так называемых «отсутствующих значений» (missing value problem), которые необходимо чем-то замещать, прежде чем выполнять статистический анализ. Строго говоря, отсутствующие значения могут быть исключены из анализа, или анализ может быть выполнен без их замещения. Однако в методах Spectral Count, основанных на подсчёте спектров фрагментации, белки, регуляция которых сильно изменяется при воздействии на клетки, могут находиться за пределами обнаружения в образцах, не подвергавшихся стрессу. В результате исключение белков с отсутствующими значениями приведёт к потере существенной доли отклика на стресс, а анализ без замещения для значительной части гипотез приведёт к нарушению условий применимости статистических тестов (например, требование на минимальное число точек в выборке, распределение по Гауссу). В свою очередь, замена отсут-

ствующих значений становится источником больших погрешностей при оценке кратных изменений количественного содержания белков в программных конвейерах, где количественному анализу предшествует идентификация белков. Существует большое количество различных стратегий замещения отсутствующих значений и даже классификация источников их происхождения [9]. В самом простом случае отсутствующее значение замещается, например минимальным значением интенсивности, измеренным в конкретном ВЭЖХ-МС эксперименте. Строго говоря, такое произвольное замещение гарантирует не только некорректный расчёт кратных изменений (Fold Change, FC), но будет отражаться и на статистической значимости: чем сильнее отличаются значения средних и дисперсии, тем меньше p -value, и наоборот. Как следствие, алгоритмы восстановления данных могут влиять на количество и ложноположительных, и ложноотрицательных признаков в результатах количественного анализа за счёт белков с восстановленными значениями.

В последнее время наиболее популярным решением является стратегия замещения отсутствующих значений на этапе, предшествующем идентификации пептидов. Стратегия основана на выравнивании наборов экспериментальных данных по времени хроматографического удерживания и массы пептида в пределах приборной погрешности (Match-Between-Runs, MBR) [10]. Ионы пептидов одинаковой первичной структуры детектируются масс-спектрометром в один и тот же момент времени. В хроматограмме, построенной по ионному току для конкретного соотношения m/z ионов пептида в зависимости от времени t , будет наблюдаться пик, высота и площадь которого коррелирует с концентрацией пептида. Данный факт широко используется для количественных оценок концентраций пептидов и белков [1, 11]. Совокупность параметров (t , m/z) представляет собой признак детектирования пептида (Peptide Feature). Если в наборе экспериментальных данных присутствует такой признак, и он имеет высокую степень сходства с пептидными признаками из других экспериментов этой же серии, но ему не была сопоставлена пептидная идентификация, то отсутствующему значению присваивается интенсивность этого схожего признака. Такая стратегия позволяет свести долю отсутствующих значений в данных к 2–3%, что позволяет безболезненно исключить их из дальнейшего рассмотрения [12]. В ряде исследований было показано, что такая процедура способна внести в данные существенное число

ошибочных замещений, которые тем не менее успешно отфильтровываются на последующих стадиях анализа [13]. Методы, основанные на использовании хроматографических интенсивностей, позиционируют в безметочной протеомике как более точные и чувствительные, особенно при использовании масс-спектрометров высокого разрешения [14–16]. В их основе, как правило, лежит использование байесовской статистики для определения количественных изменений в наборах пептидов, которые предположительно связаны с одной протеоформой [15], и вводится концепция апостериорных вероятностей как замена статистически необоснованному выбору порога кратных изменений концентраций белков [16]. Отметим, что источниками ошибок для этих методов могут быть несовершенства алгоритмов выравнивания экспериментальных данных и детектирования пептидных признаков, а также технические особенности работы прибора. В связи с этим необходимы нормировка данных, эффективный контроль качества пептидной выборки и уровня ложноположительных результатов в количественном анализе.

Известно, что вероятность совершения ложных статистических выводов значительно возрастает при одновременном тестировании большого числа гипотез [17]. В статистике определяют ошибки I-го и II-го рода. Ошибка I-го рода совершается при отклонении верной нулевой гипотезы (ложноположительный результат), тогда как ошибка II-го рода возникает при принятии неверной нулевой гипотезы (ложноотрицательный результат). Смысл всех существующих методов контроля ложноположительных результатов сводится к установлению более жёсткого статистического порога. Так, в поправке Бонферрони пороговая статистическая значимость для каждого теста находится делением стандартного значения порога на количество тестов. Коррекция Бонферрони является консервативной и приводит к высокому уровню ложных отрицаний при большом числе сравнений. Другой способ, метод Холма, пошагово вычисляет уровни значимости $\alpha'(i)$ в зависимости от ранга гипотезы i , $\alpha'(i) = \alpha/(m-i+1)$, где α – статистическая значимость, m – число гипотез. Наиболее популярной мерой контроля ошибок первого рода является частота ложноположительных результатов (false discovery rate, fdr), которая определяется как ожидаемая доля неправильно отклоненных нулевых гипотез среди всех отклонений. В методе Бенджамини–Холмберга для каждого номера гипотезы i и заданного значения q проверяется условие $p(i) \leq iq/m$, где m – общее количество тестов. Метод приме-

няется повсеместно в биологических исследованиях, в том числе и в задачах количественного анализа протеомных данных.

Целесообразность использования фиксированных статистических порогов при анализе данных до сих пор горячо обсуждается научным сообществом [18]. За время нашей работы в области количественной протеомики [19–21] мы также пришли к выводу, что использование фиксированного порога $p < 0,05$ для любого набора данных может приводить к потере потенциально ценной биологической информации или вносить в данные статистический шум.

В данной работе мы рассмотрели методы безметочного количественного анализа белков, интегрированные в различные протеомные поисковые конвейеры для эффективного определения уровня ошибок I-го рода в протеомных данных. В частности, мы показываем, что ошибки I-го рода представляют серьезную проблему при анализе раннего отклика на стресс: в случаях, когда протеомный ответ слабо выражен. В работе также предложен простой и наглядный способ оптимизации статистического порога на основе метода Бенджамини–Хохберга, анализа плотности распределения точек на диаграммах рассеяния и генных онтологий (ГО). Предложенная методика оптимизации статистического порога будет полезна исследователям, занимающимся количественным анализом протеомных данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы. Были использованы экспериментальные данные для модельных образцов *Saccharomyces cerevisiae* из исследования iPRG-2015 (https://abrf.org/sites/default/files/temp/RGs/iPRG/iprg2015_study_instructions_final.pdf). В этом исследовании четыре триптических гидролизата шести белков в различных известных концентрациях были смешаны с одинаковым количеством триптического гидролизата белков дрожжей. Этот набор данных является количественным стандартом сравнительной протеомики.

Для сравнения безметочных методов использовались клеточная модель нормальных астроцитов (предоставлена для протеомного анализа сотрудниками Института молекулярной биологии им. Энгельгардта) и дикий тип *S. cerevisiae*. Клетки астроцитов подвергались обработке интерфероном- α в течение 24 ч, согласно стандартному протоколу [20], и являлись в данном исследовании моделью позднего отклика

клеток на стресс. Клетки дрожжей дикого типа обрабатывали этанолом в течение 1,5 ч и являлись моделью раннего отклика клеток на стресс [19].

Идентификация пептидов и белков. Экспериментальные данные формата (raw) конвертировались в форматы (mgf) и (mzML) с помощью программы MSConvert, используя параметры по умолчанию [22]. Для идентификации пептидов использовались базы данных белков человека и дрожжей SwissProt (sp) (загружены 16.10.2019). Для работы с модельными образцами дрожжей использовалась база из исследования iPRG-2015. Поиски выполнялись по объединенным базам (sp+sp_reverse); базы ложных белков создавались считыванием sp справа налево (sp_reverse). Для поиска пептид-спектральных совпадений использовались поисковые машины MSFragger [23] и IdentiPy [24] со следующими параметрами: относительная точность измерения масс ионов-предшественников – 15 и 20 ppm, ошибка определения масс ионов-продуктов – 0,01 Да и 20 ppm для модельного образца дрожжей из iPRG-2015 и для остальных данных соответственно. Остальные параметры – по умолчанию. Для пост-обработки результатов поиска использовалось программное обеспечение Scavenger [25] и Percolator [26]. Расчёт индексов NSAF реализован в Scavenger, статистический анализ выполнялся, как опубликовано ранее [19, 20]. Отсутствующие значения количественных индексов белков, NSAF, замещались минимальным значением индекса в реплике и преобразовывались в \log_{10} -шкалу с последующим выравниванием глобального распределения относительно нуля и нормировки на стандартное отклонение. Для количественных алгоритмов Diffacto [15] и Triqler [16] интенсивности пептидов извлекались автоматически в программном конвейере IdentiPy/Scavenger. Использование Triqler было адаптировано для программы Scavenger. Отсутствующие значения хроматографических интенсивностей пептидов замещались с использованием подхода MBR после идентификации пептид-спектральных совпадений, преобразовывались в \log_{10} -шкалу и нормализовались с помощью методов, реализованных в Diffacto и Triqler. Таблицы с идентификациями пептидов и белков поисковым конвейером X!Tandem/MPscore взяты из ранее опубликованной работы [21]. Анализ генных онтологий выполнен с помощью программы GOrrilla; порогом статистической значимости обогащения терминов ГО было принято $\alpha = 0,05$ с учётом корректировки на множественные сравнения по Бенджамини–Хохбергу [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использование модельных образцов *S. cerevisiae* для экспериментального определения ошибок I-го рода. Для экспериментального определения ошибок I-го рода были использованы четыре модельных образца, каждый из которых содержал одинаковое количество триптического гидролизата *S. cerevisiae* (фоновые белки), смешанного с шестью белками других организмов в известных и различных концентрациях. Эти шесть белков в дальнейшем будут называться контрольными. Различные поисковые машины (MSFragger [23], IdentiPy [24]) и программы для пост-обработки идентификаций (Scavager [25], Percolator [26]) были объединены в пять программных конвейеров, чтобы оценить, как изменяются результаты количественного анализа в зависимости от использования того или иного программного продукта.

На рисунке 1, *a* для разных протеомных конвейеров показаны доли *k* правильно определенных контрольных белков (true positive, tp) среди общего числа белков *N*, которые преодолели

статистический порог. Доля таких белков варьируется от 0% до 100% для разных конвейеров, а также имеет существенный разброс в пределах одного конвейера для разных попарных сравнений образцов (макс. ± 40%). Логично предположить, что такой разброс может быть связан с соотношениями концентраций контрольных белков в образцах. На рис. 1, *a* ошибкам I-го рода соответствуют значения 1-tp. На рис. 1, *b* показаны ошибки 2-го рода – доли *X-k* контрольных белков (false negatives, fn), не преодолевших статистический порог среди ожидаемых контрольных белков *X*. Ожидаемыми контрольными белками считались белки, для которых отношения фактических концентраций FC были вне диапазона $0,846 < FC < 1,182$. Граничные значения интервала соответствуют фактическому соотношению концентраций контрольных белков в модельных образцах. Было принято допущение, что данные значения могут представлять собой предельные значения чувствительности количественных методов. Результаты показали, что действительно методы, основанные на анализе хроматографических интенсивностей, демон-

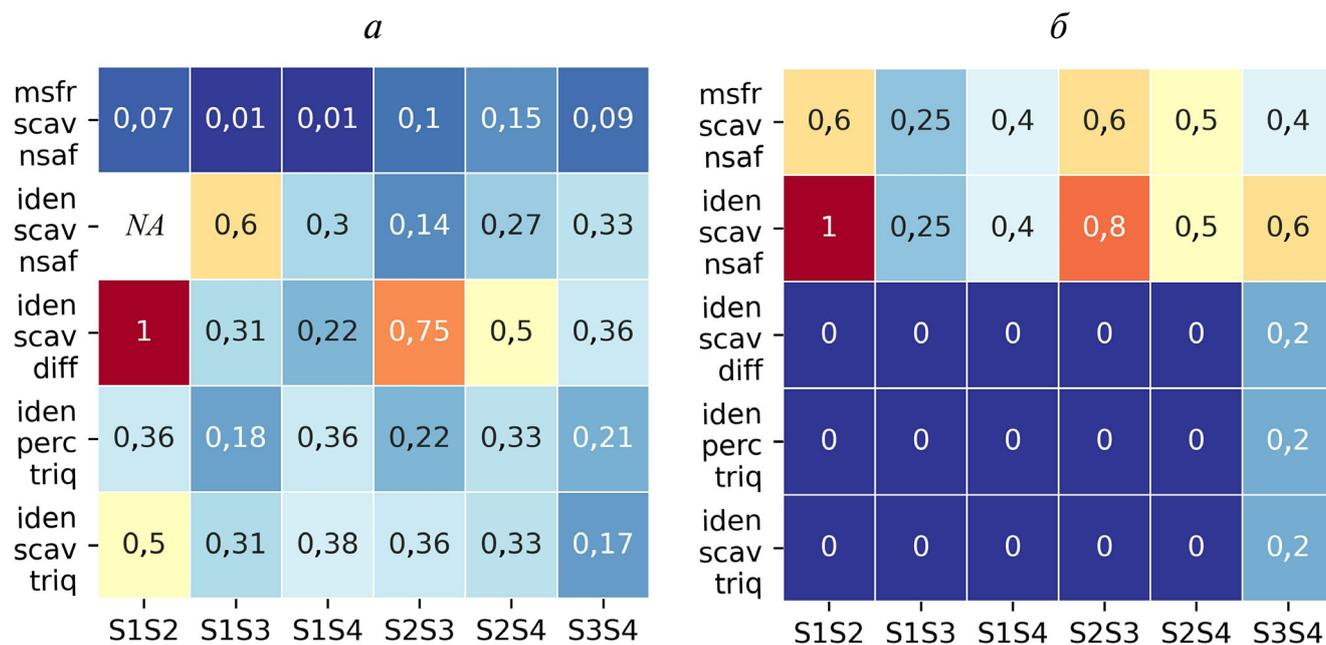


Рис. 1. Доли правильных (true positive, tp) белков (*a*) и ложно отрицательных (false negative, fn) результатов (*b*) для разных программных конвейеров в попарных сравнениях модельных образцов дрожжей. *a* – Доля tp контрольных белков *k* в общем числе белков *N*, которые преодолели статистический порог $fd_{гн}$ (*q*-value) = 0,05 и порог кратных изменений FC = 1,0; $tp = k/N$. «NA» соответствует $k, N = 0$. Значения 1-tp соответствуют ошибкам I-го рода. *b* – Доля fn ложноотрицательных результатов $X-k$ относительно ожидаемых белков *X*; $fn = (X-k)/X$. Значения fn соответствуют ошибкам II-го рода. Ожидаемыми дифференциально регулируемыми белками считались белки, для которых отношения фактических концентраций FC были вне диапазона $0,846 < FC < 1,182$. Обозначения: поисковые машины MSFragger (msfr), IdentiPy (iden); программы для пост-обработки пептид-спектральных совпадений Scavager (scav), Percolator (perc); количественные методы NSAF (nsaf), Triqler (trig), Diffacto (diff); попарные сравнения модельных образцов *SiSj*, $i \neq j$. Цветовая шкала соответствует изменению значений от 0,0 до 1,0. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

стрируют как высокую чувствительность к слабым изменениям концентраций ($FC = 1,2$), так и более высокую точность определения множества белков с изменениями концентраций.

Следует учитывать, что в общем случае белки фона, преодолевшие критерии отбора, могут быть идентифицированы по пептидам, часто встречаемым в протеомных образцах контаминантов, либо совпадать с пептидами контрольных белков. Проверка по базе данных таких контаминантов (<ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP>) показала, что пептиды, по которым идентифицированы фоновые белки, в белках-контаминантах отсутствуют. Пересечений с последовательностями контрольных белков также обнаружено не было.

Одним из самых простых способов оценить точность определения кратных изменений концентрации белка является использование модельных образцов с белками известных концентраций. На рис. 2 показаны корреляции между рассчитанным и фактическим соотношениями концентраций для каждого белка во всех парах образцов из исследования iPRG-2015. Наилучшие результаты с угловыми коэффициентами близкими к единице были получены при использовании программных конвейеров, в которые интегрированы алгоритмы количественного анализа интенсивностей пептидов, Diffacto и Triqler. Использование индекса NSAF приводит к двукратному занижению расчётных значений $|\log_2 FC|$, что необходимо учитывать в дальнейшем анализе. Отметим, что для всех конвейеров наблюдался разброс белков фона в широком диапазоне значений $|\log_2 FC|$, что согласуется с результатами на рис. 1 и диктует необходимость выбора более строгих статистических критериев.

Для оптимизации критериев отбора исследуем зависимость доли контрольных белков k в общем числе белков N , которые преодолевают статистический порог, от значения этого порога, fdr_{BH} (или q -value) (рис. 3, а). Согласно полученным зависимостям, статистические пороги в некоторых случаях могут быть выбраны так, чтобы отсеять фоновые (ложные) белки, максимально сохранив контрольные (правильные): оптимальным считается порог, при котором доля контрольных белков $tp \rightarrow \max$ при $fn \rightarrow \min$. Так оптимальными значениями статистических порогов, усреднёнными по попарным сравнениям образцов, были приняты 0,003, 0,03 и 0,05 для конвейеров, в которые интегрированы, соответственно, алгоритмы Triqler, Diffacto и NSAF.

Была исследована также зависимость доли контрольных белков от порогового значения кратных изменений $|\log_2 FC|$ для оптимальных порогов статистической значимости (рис. 3, б).

Наблюдалась ожидаемая зависимость: чем выше порог отбора кратных изменений концентраций FC , тем меньше ложноположительных результатов в количественном анализе. Так, например, при $|\log_2 FC| > 3,0$ доля ложноположительных результатов в количественном анализе для большинства рассмотренных конвейеров близка к нулю, тогда как для диапазона $0,5 < |\log_2 FC| < 2,0$ она может составлять от 10% до 90%.

Поздний и ранний отклик на стресс на примере анализа количественных изменений белков в клеточных моделях астроцитов и *S. cerevisiae*. Для исследования общих закономерностей в распределениях ошибок I-го рода были использованы протеомные данные для клеточных моделей астроцитов и дрожжей. Модель нормальных астроцитов являлась примером позднего отклика на стресс, когда изменения на трансляционном уровне сильно выражены (24 ч интерферон- α). Клетки *S. cerevisiae* дикого типа, инкубированные с этанолом в течение 1,5 ч, моделировали слабые изменения на уровне протеома (ранний отклик на стресс). На рис. 4 для данных моделей показано сравнение классических методов корректуры на множественные сравнения. Для панорамного количественного анализа протеомов (с глубиной идентификации более 2000 белков) применение метода Бенджамини–Хохберга является лучшим выбором. Однако обратим внимание, что в случае раннего отклика стандартные статистические критерии отбора $fdr_{BH} < 0,05$ проходит в 2–3 раза больше белков, чем в случае позднего. При этом 40% таких белков сосредоточено в области слабых количественных изменений $0,5 < |\log_2 FC| < 2,0$, где ожидается высокий уровень ложно отвергнутых гипотез (согласно рис. 3). При использовании алгоритма Triqler (рис. 4, б) этот эффект выражен слабее (206 и 227 белков, соответственно, в позднем и раннем откликах). Такое наблюдение также согласуется с результатами анализа модельных образцов дрожжей и подтверждает, что в раннем отклике ожидается большее число ложноположительных результатов.

Оптимизация критериев отбора и оценка биологической релевантности дифференциально регулированных белков на основе анализа геномных онтологий. Для оценки биологической релевантности молекулярных изменений в биологических моделях в ответ на стресс был использован анализ ГО. Как видно из рис. 5, ужесточение статистического порога приводит к увеличению относительного числа дифференциально экспрессированных генов, вовлеченных в обогащенные биологические процессы. Этот эффект наиболее заметен при анализе белков с не-

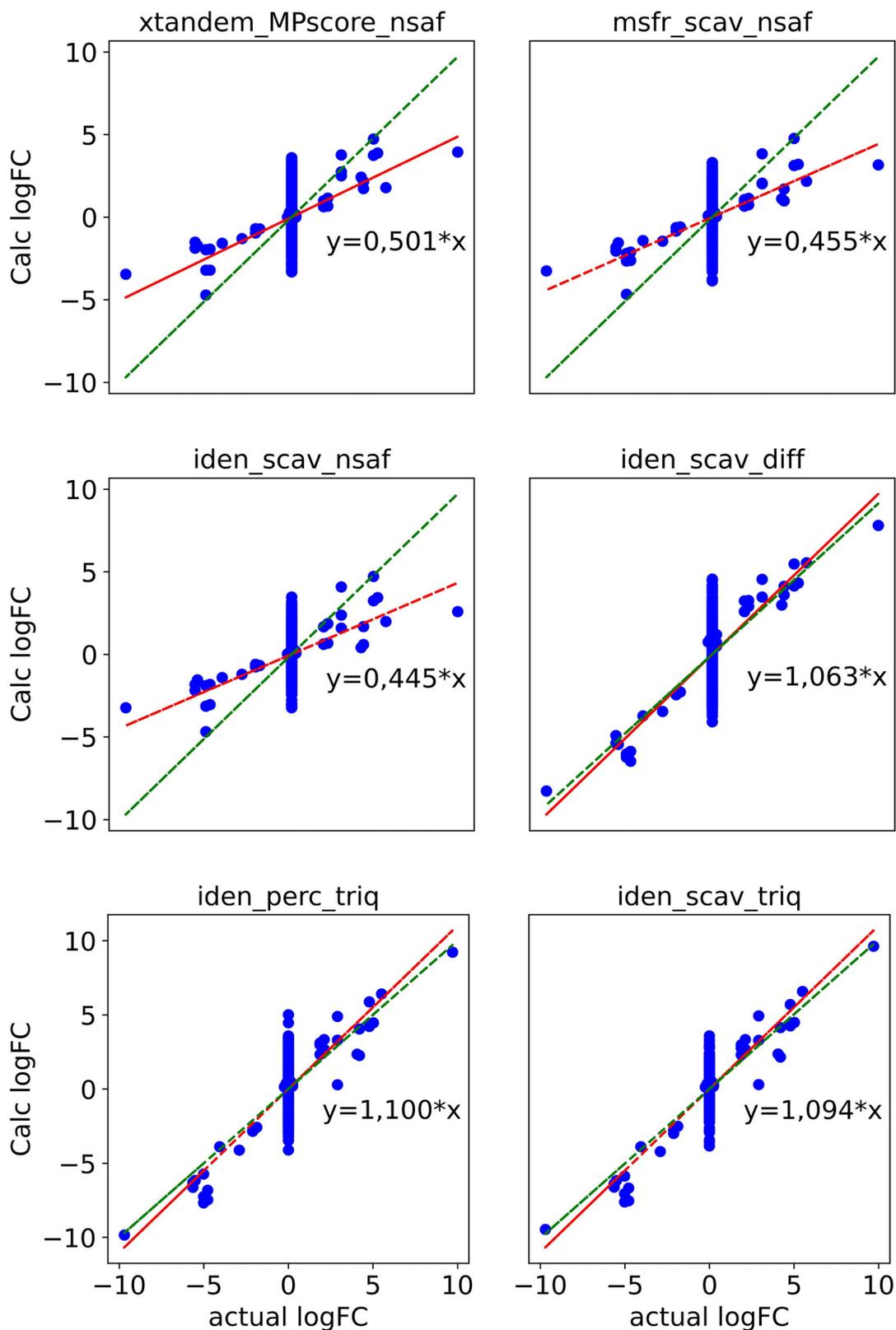


Рис. 2. Сравнение расчётных и фактических соотношений концентраций контрольных и фоновых белков. Расчётные значения для каждого белка усреднены по техническим репликам. Для фоновых белков фактическое отношение концентраций принято за единицу. Красный и зелёный пунктир соответствуют линейной аппроксимации точек и ожидаемой зависимости $y = x$ соответственно

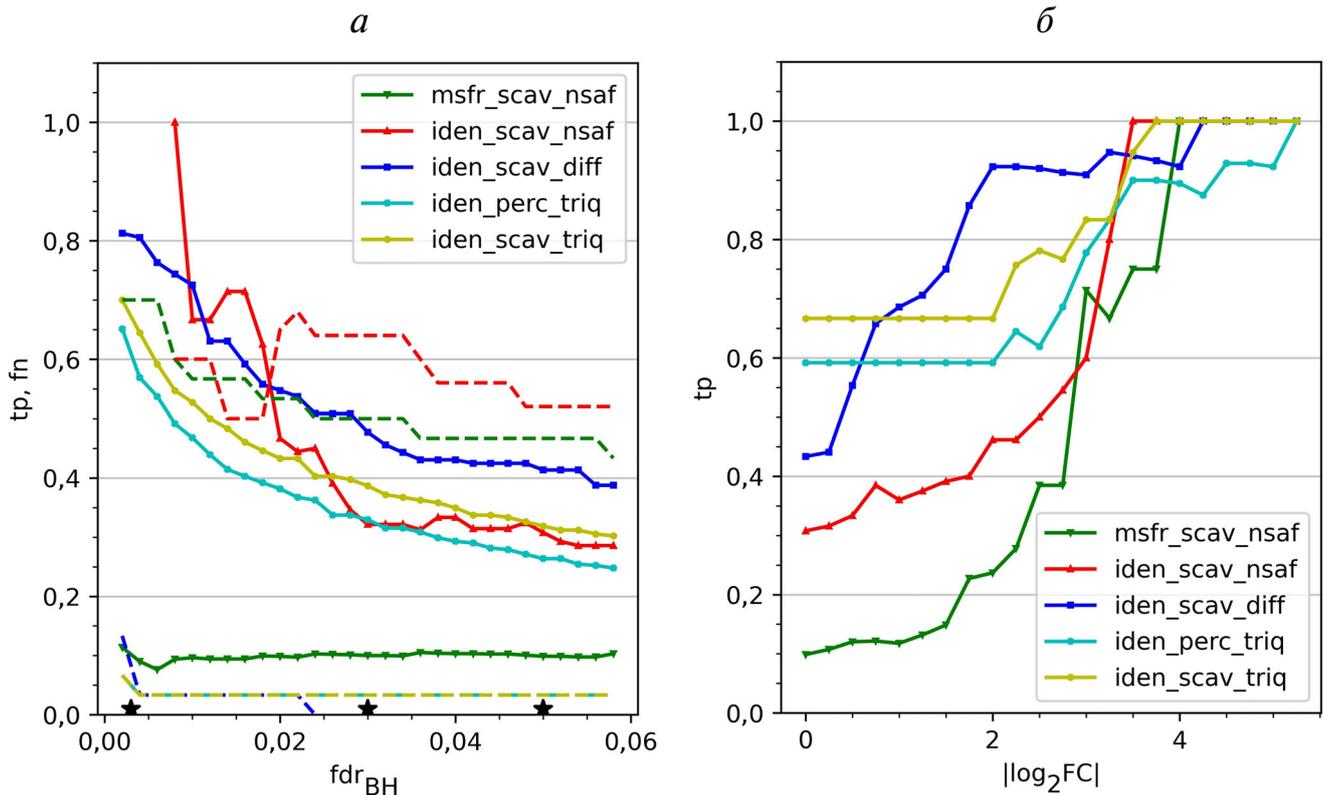


Рис. 3. Зависимость доли правильно определенных (true positive, tp) белков и ложноотрицательных (false negative, fn) результатов от критериев отбора дифференциально регулированных белков: *a* – статистический порог, fdr_{BH} (q -value); *б* – пороговое значение кратных изменений, $|\log_2FC|$, при фиксированном (оптимизированном) пороге статистической значимости. Оптимизированные пороги обозначены \star и равны 0,003 (Triqler), 0,03 (Diffacto), 0,05 (NSAF). Доля контрольных белков k среди общего числа статистически значимых белков N : $tp = k/N$ (сплошная линия). Доля ложноотрицательных результатов $X-k$ относительно ожидаемых белков X : $fn = (X-k)/X$ (пунктир). Значения tp и fn усреднены по парным сравнениям образцов из iPRG-2015

большими изменениями концентраций (группы down – в астроцитах, up и down – в пекарских дрожжах рис. 5). Данный результат хорошо согласуется с результатами анализа модельных образцов дрожжей и подтверждает, что ужесточением статистического порога возможно сократить число ложноположительных результатов в области малых кратных изменений. Этой тенденции не подчиняются результаты анализа раннего отклика методом Triqler, для которого, очевидно, в условиях раннего стресса в выбранном диапазоне пороговых значений статистической значимости такое правило не работает (рис. 5, б). Также в выбранном диапазоне наблюдается определенная несогласованность и для результатов, полученных методом NSAF.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ модельных образцов дрожжей показал, что ошибки I-го рода неравномерно распределены по значениям кратных изменений концен-

траций белков и могут представлять серьёзную проблему для диапазона слабых изменений концентраций, $0,5 < |\log_2FC| < 2,0$. Это ожидаемый результат. На практике такой эффект обычно компенсируют отбором по пороговому значению кратных изменений (FC), который, как правило, варьируется в интервале 1,5–2,5 и выбирается произвольным образом. Однако после такого отбора рассчитанный уровень ложноположительных результатов фактически следует признавать недействительным [16]. Такой подход также будет негативным образом сказываться на результатах анализа раннего отклика на стресс, когда изменения на уровне протеома слабо выражены. Фактически, в случае раннего отклика такой отбор отсеет не только ложноположительные результаты, но и существенную часть правильных. Более эффективной стратегией с этой точки зрения является оптимизация статистического критерия, характеризующего степень доверия рассчитанным значениям кратных изменений.

Метод Бенджамини–Хохберга, несомненно, является оптимальным выбором для задач

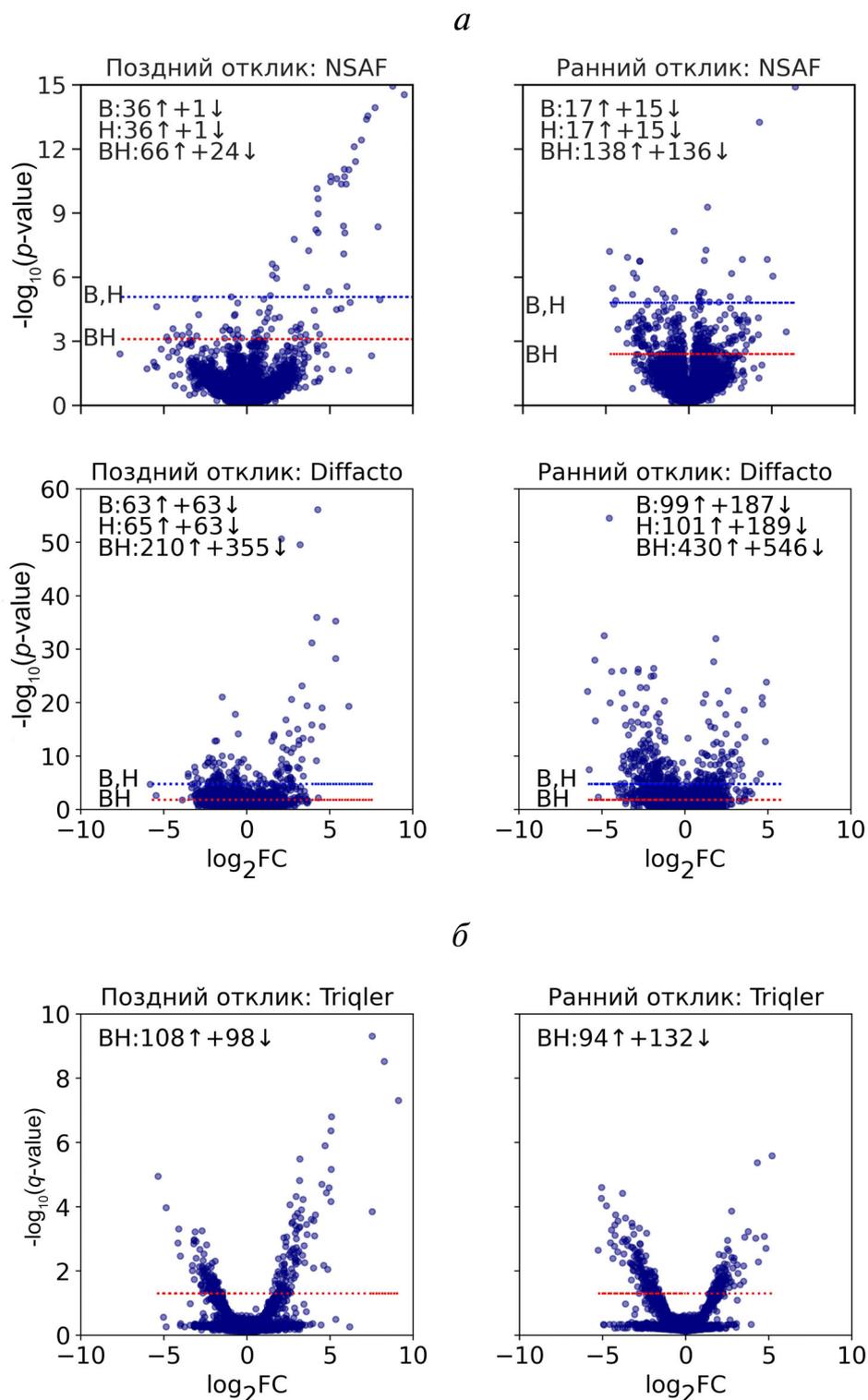


Рис. 4. Сравнение классических методов контроля уровня ложноположительных результатов в случае позднего (число тестов = 3500) и раннего (число тестов = 2300) отклика клеток на внешнее воздействие (*a*). Результаты количественного анализа с использованием метода Triqler для случаев позднего и раннего отклика клеток на стресс (*б*). Идентификация и пост-поисковая валидация белков выполнены программным конвейером Identipy/Scavager. Горизонтальный пунктир соответствует порогу 0,05; В – поправка Бонферрони, Н – метод Холма, ВН – метод Бенджамини–Хохберга. Стрелки $\uparrow\downarrow$ соответствуют направлению дифференциальной регуляции белков. Для NSAF значения FC скорректированы согласно угловым коэффициентам (рис. 2). Ось X: кратное изменение концентраций белков FC в \log_2 -шкале. Ось Y: статистическая значимость, p -value или q -value, в отрицательной \log_{10} -шкале

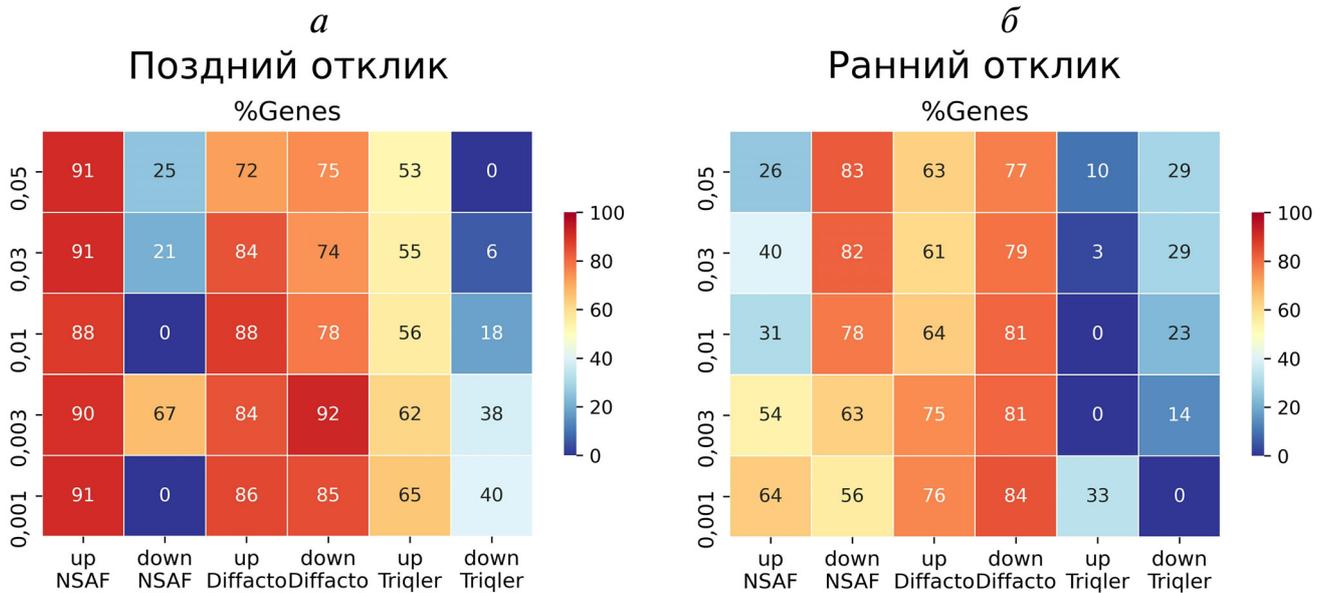


Рис. 5. Зависимость числа генов, вовлечённых в обогащённые биологические процессы, от количества ошибок I-го рода в позднем и раннем отклике клеток на стресс. Для NSAF значения FC скорректированы, согласно угловым коэффициентам на рис. 2. Поздний отклик: инкубация астроцитов 24 ч с IFN α (а), ранний отклик: инкубация *S. cerevisiae* 1,5 ч с этанолом (б). Обозначения: %Genes – число генов, вовлечённых в обогащённые ГО, относительно общего числа дифференциально экспрессированных генов

панорамной количественной протеомики [28, 29], однако использование одинакового статистического порога для отбора дифференциально регулированных белков способно привести к потере потенциально ценной биологической информации. В нашей работе показано, что оптимальный статистический порог не только позволяет сократить число ложноположительных результатов в области малых кратных изменений концентраций (рис. 3), но и коррелирует с увеличением относительного числа дифференциально экспрессированных генов, вовлечённых в обогащение ГО (рис. 5). Использование различных методов и стратегий количественного анализа, в том числе поисковых машин, программ пост-поисковой обработки данных, стратегий восстановления отсутствующих значений и, в наибольшей степени, различных подходов для статистической обработки количественных данных существенным образом отражается как на точности рассчитанных кратных изменений концентраций белков, так и на значениях статистической значимости (рис. 2 и 4). В случае раннего отклика клеток на стресс стандартный статистический порог может проходить в 2–3 раза больше белков, чем в случае позднего, причём до 40% таких белков сосредоточено в области малых изменений концентрации белков (рис. 4), где ожидается больше ложноположительных результатов (рис. 2). Возникает вопрос, как отбирать дифференциально

регулируемые признаки в условиях разной чувствительности количественных методов и программных конвейеров, и как выбирать оптимальный статистический порог в случае анализа реальных биологических моделей. На основе полученных результатов мы предлагаем дополнить протокол отбора дифференциально экспрессированных признаков анализом распределения плотности точек на диаграммах рассеяния (рис. 6). В основе такого анализа лежат два предположения: (1) плотное множество точек на диаграмме рассеяния ($\log_2 FC$, $\log_{10} p$ -value) соответствует неизменной части протеома; и (2) граница между «плотным» и «разреженным» множеством точек определяется как сумма третьего квартиля и полутора межквартильных расстояний распределения плотности точек (отклонение $+2,698\sigma$ от медианы). Если порог $0,05 \text{ fdr}_{\text{вн}}$ проходит ниже границы, то в данных ожидается статистический шум, а уровень ошибок I-го рода занижен (что актуально для метода Diffacto, рис. 4, а). Если порог $0,05 \text{ fdr}_{\text{вн}}$ проходит выше границы, то предполагается высокий уровень ошибок II-го рода (как в случае с методами NSAF и Triqler, рис. 4, б). В таких случаях целесообразно будет изменить порог отбора в сторону ужесточения (для Diffacto) или расслабления (для NSAF и Triqler). Новый порог можно считать оптимальным и обоснованным, если его использование приводит к увеличению доли дифференци-

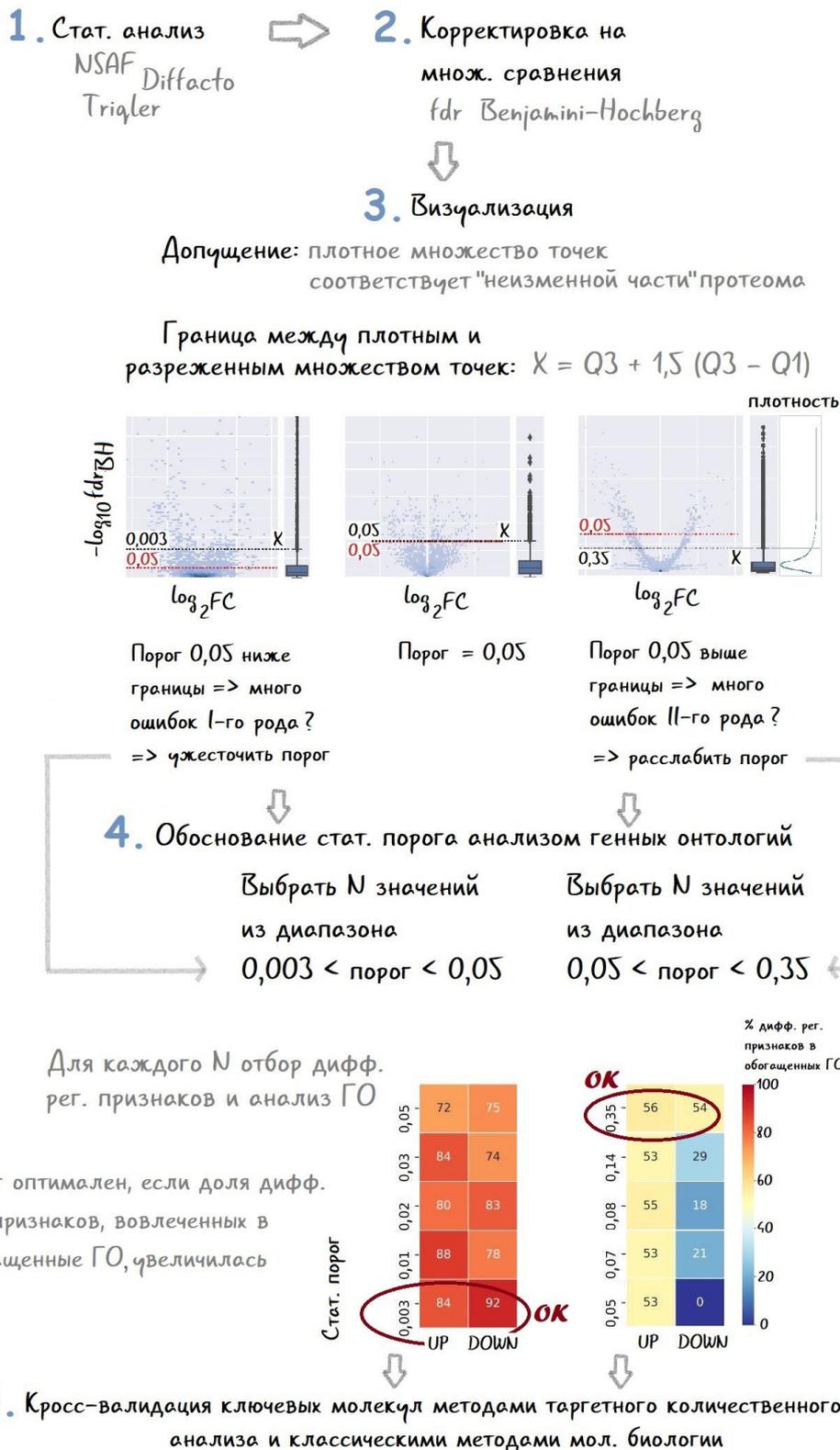


Рис. 6. Схема отбора дифференциально регулированных белков и оптимизации статистического порога на основе анализа плотности распределения точек на диаграммах рассеяния и анализа генных онтологий для количественной протеомики. Обозначения: NSAF, Diffacto, Triqler – методы безметочного количественного анализа; fdr_{BH} – ожидаемая доля ложных отклонений гипотез, скорректированная на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга; Q1, Q3 – первый и третий квартили распределения плотности точек по оси $-\log_{10}fdr_{BH}$; FC – кратное изменение количественного содержания белка

ально регулированных признаков, вовлечённых в обогащённые термины ГО, что, в свою очередь, должно способствовать исчерпывающей интерпретации количественных данных. Согласно предложенной методике, были определены новые статистические пороги для моделей раннего и позднего отклика, а анализ обогащённых ГО дифференциально регулированных признаков, отобранных согласно оптимизированным порогам, показал увеличение доли дифференциально регулированных белков в обогащённых ГО (рис. S1 в Приложении). Такой подход предлагается интерпретировать как способ качественной визуализации уровня ошибок I-го и II-го рода в результатах, полученных в условиях отличающихся статистических дизайнов с помощью методов, обладающих различной статистической мощностью.

Применение такого подхода не бесспорно. Во-первых, в работе мы используем статистический анализ обогащения ГО как источник данных, комплементарных результатам протеомного анализа, считая положительную корреляцию подтверждением релевантности отобранных дифференциально регулированных признаков. В то же время статистический анализ обогащений ГО сам содержит ошибки I-го и II-го рода. Во-вторых, если к использованию более жёсткого порога можно отнестись снисходительно, то идея его расслабления вызывает обоснованный протест, так как уменьшая уровень ошибок II-го рода, мы можем существенно увеличить долю ложноположительных результатов (рис. S1 в Приложении). Поэтому мы предлагаем использовать анализ плотности распределения точек, как дополнительную качественную характеристику мощности статистического комплекса, применяемого для количественного анализа в протеомике. В сочетании с анализом ГО такой подход позволит обосновать выбор другого статистического порога, способствующего более полной интерпретации количественных данных. Однако следует понимать, что последнее подразумевает привлечение дополнительных статистических и/или экспериментальных методов для валидации результатов такого анализа. На этапе генерации и проверки ключевой гипотезы для этих целей целесообраз-

но использовать методы таргетного количественного анализа, такие как метод мониторинга множественных переходов (Multiple reaction monitoring, MRM), иммунологические методы и полимеразную цепную реакцию.

В заключение отметим, что анализ геномных онтологий довольно давно служит простой и интуитивно понятной метрикой биологической релевантности найденных количественных изменений [30, 31]. Естественным ограничением данного метода интерпретации количественных данных являются новые и ранее не описанные регуляторы и участники биологических процессов – это ситуация аналогичная «поиску под фонарем» – мы интерпретируем ту часть количественных данных, для которой известна классификация/аннотация (экспериментально установлена, предсказана с некоторой точностью). Однако это не препятствует применению анализа ГО в рамках предложенного в работе подхода. Мы считаем, что анализ плотности распределения количественных изменений может быть полезен и в других ОМИКС-подходах, где возникает схожая проблематика.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант №20-14-00229).

Благодарности. Культура астроцитов для протеомного анализа была предоставлена сотрудниками ИМБ РАН, проф. П.М. Чумаковым и А.В. Соболевой в рамках работ, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (грант №18-29-01059-мк).

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.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 3, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nikolov, M., Schmidt, C., and Urlaub, H. (2012) Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview, in *Quantitative Methods in Proteomics* (Marcus, K., ed.) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 85-100, doi: 10.1007/978-1-61779-885-6_7.
2. Zhang, X., Fang, A., Riley, C. P., Wang, M., Regnier, F. E., and Buck, C. (2010) Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics – a review, *Anal. Chimica Acta*, **664**, 101-113, doi: 10.1016/j.aca.2010.02.001.
3. Podwojski, K., Stephan, C., and Eisenacher, M. (2012) Important issues in planning a proteomics experiment: statistical considerations of quantitative proteomic data, in *Quantitative Methods in Proteomics*, (Marcus, K., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 3-21, doi: 10.1007/978-1-61779-885-6_1.

4. Tuli, L., and Resson, H. W. (2009) LC–MS based detection of differential protein expression, *J. Proteomics Bioinform.*, **02**, 416–438, doi: 10.4172/jpb.1000102.
5. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., et al. (2005) Exponentially modified protein abundance index (EmPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein, *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1265–1272, doi: 10.1074/mcp.M500061-MCP200.
6. Griffin, N. M., Yu, J., Long, F., Oh, P., Shore, S., et al. (2010) Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 83–89, doi: 10.1038/nbt.1592.
7. Trudgian, D. C., Ridlova, G., Fischer, R., Mackeen, M. M., Ternette, N., et al. (2011) Comparative evaluation of label-free SINQ normalized spectral index quantitation in the central proteomics facilities pipeline, *Proteomics*, **11**, 2790–2797, doi: 10.1002/pmic.201000800.
8. Webb-Robertson, B.-J. M., Wiberg, H. K., Matzke, M. M., Brown, J. N., Wang, J., et al. (2015) Review, evaluation, and discussion of the challenges of missing value imputation for mass spectrometry-based label-free global proteomics, *J. Proteome Res.*, **14**, 1993–2001, doi: 10.1021/pr501138h.
9. Karpievitch, Y. V., Dabney, A. R., and Smith, R. D. (2012) Normalization and missing value imputation for label-free LC-MS analysis, *BMC Bioinformatics*, **13**, S5, doi: 10.1186/1471-2105-13-S16-S5.
10. Nagaraj, N., Kulak, N. A., Cox, J., Neuhauser, N., Mayr, K., et al. (2012) System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top orbitrap, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111.013722, doi: 10.1074/mcp.M111.013722.
11. Wiener, M. C., Sachs, J. R., Deyanova, E. G., and Yates, N. A. (2004) Differential mass spectrometry: a label-free LC–MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures, *Anal. Chem.*, **76**, 6085–6096, doi: 10.1021/ac0493875.
12. Zhang, B., Käll, L., and Zubarev, R. A. (2016) DeMix-Q: quantification-centered data processing workflow, *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 1467–1478, doi: 10.1074/mcp.O115.055475.
13. Lim, M. Y., Paulo, J. A., and Gygi, S. P. (2019) Evaluating false transfer rates from the match-between-runs algorithm with a two-proteome model, *J. Proteome Res.*, **18**, 4020–4026, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00492.
14. Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1367–1372, doi: 10.1038/nbt.1511.
15. Zhang, B., Pirmoradian, M., Zubarev, R., and Käll, L. (2017) Covariation of peptide abundances accurately reflects protein concentration differences, *Mol. Cell. Proteomics*, **16**, 936–948, doi: 10.1074/mcp.O117.067728.
16. The, M., and Käll, L. (2019) Integrated identification and quantification error probabilities for shotgun proteomics, *Mol. Cell. Proteomics*, **18**, 561–570, doi: 10.1074/mcp.RA118.001018.
17. Chen, S.-Y., Feng, Z., and Yi, X. (2017) A general introduction to adjustment for multiple comparisons, *J. Thorac. Dis.*, **9**, 1725–1729, doi: 10.21037/jtd.2017.05.34.
18. Kennedy-Shaffer, L. (2019) Before $p < 0.05$ to beyond $p < 0.05$: using history to contextualize p -values and significance testing, *Am. Stat.*, **73**, 82–90, doi: 10.1080/00031305.2018.1537891.
19. Bubis, J. A., Spasskaya, D. S., Gorshkov, V. A., Kjeldsen, F., Kofanova, A. M., et al. (2020) Rpn4 and proteasome-mediated yeast resistance to ethanol includes regulation of autophagy, *Appl. Microbiol. Biot.*, **104**, 4027–4041, doi: 10.1007/s00253-020-10518-x.
20. Tarasova, I. A., Tereshkova, A. V., Lobas, A. A., Solovyeva, E. M., Sidorenko, A. S., et al. (2018) Comparative proteomics as a tool for identifying specific alterations within interferon response pathways in human glioblastoma multiforme cells, *Oncotarget*, **9**, 1785–1802, doi: 10.18632/oncotarget.22751.
21. Bubis, J. A., Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., and Gorshkov, M. V. (2017) Comparative evaluation of label-free quantification methods for shotgun proteomics: Lfq methods for proteomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **31**, 606–612, doi: 10.1002/rcm.7829.
22. Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., and Mallick, P. (2008) ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development, *Bioinformatics*, **24**, 2534–2536, doi: 10.1093/bioinformatics/btn323.
23. Kong, A. T., Leprevost, F. V., Avtonomov, D. M., Mellacheruvu, D., and Nesvizhskii, A. I. (2017) MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics, *Nat. Methods*, **14**, 513–520, doi: 10.1038/nmeth.4256.
24. Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Lobas, A. A., Bubis, J. A., Tarasova, I. A., et al. (2018) IdentiPy: an extensible search engine for protein identification in shotgun proteomics, *J. Proteome Res.*, **17**, 2249–2255, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00640.
25. Ivanov, M. V., Levitsky, L. I., Bubis, J. A., and Gorshkov, M. V. (2019) Scavenger: a versatile postsearch validation algorithm for shotgun proteomics based on gradient boosting, *Proteomics*, **19**, 1800280, doi: 10.1002/pmic.201800280.
26. The, M., MacCoss, M. J., Noble, W. S., and Käll, L. (2016) Fast and accurate protein false discovery rates on large-scale proteomics data sets with Percolator 3.0, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **27**, 1719–1727, doi: 10.1007/s13361-016-1460-7.
27. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists, *BMC Bioinformatics*, **10**, 48, doi: 10.1186/1471-2105-10-48.
28. Lualdi, M., and Fasano, M. (2019) Statistical analysis of proteomics data: a review on feature selection, *J. Proteomics*, **198**, 18–26, doi: 10.1016/j.jprot.2018.12.004.
29. Diz, A. P., Carvajal-Rodríguez, A., and Skibinski, D. O. F. (2011) Multiple hypothesis testing in proteomics: A strategy for experimental work, *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M110.004374, doi: 10.1074/mcp.M110.004374.
30. Fruzangohar, M., Ebrahimie, E., and Adelson, D. L. (2017) A novel hypothesis-unbiased method for gene ontology enrichment based on transcriptome data, *PLoS One*, **12**, e0170486, doi: 10.1371/journal.pone.0170486.
31. Gong, H., Wu, T. T., and Clarke, E. M. (2014) Pathway-gene identification for pancreatic cancer survival via doubly regularized cox regression, *BMC Syst. Biol.*, **8**, S3, doi: 10.1186/1752-0509-8-S1-S3.

PROTEOMICS OF CELLULAR RESPONSE TO STRESS: TAKING CONTROL OF FALSE POSITIVE RESULTS

I. T. Gabdrakhmanov¹, M. V. Gorshkov^{2,3}, and I. A. Tarasova^{3*}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center for Chemical Physics,
Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: iatarasova@yandex.ru

One of the main goals of quantitative proteomics is molecular profiling of cellular response to stress at the protein level. To perform this profiling, statistical analysis of experimental data involves multiple testing of a hypothesis about the equality of protein concentrations between the cells under normal and stress conditions. This analysis is then associated with the multiple testing problem dealing with the increased chance of obtaining false positive results. A number of solutions to this problem are known, yet, they may lead to the loss of potentially important biological information when applied with commonly accepted thresholds of statistical significance. Using the proteomic data obtained earlier for the yeast samples containing proteins at known concentrations and the biological models of early and late cellular responses to stress, we analyzed dependences of distributions of false positive and false negative rates on the protein fold changes and thresholds of statistical significance. Based on the analysis of the density of data points in the volcano plots, Benjamini–Hochberg method, and gene ontology analysis, visual approach for optimization of the statistical threshold and selection of the differentially regulated proteins has been suggested, which could be useful for researchers working in the field of quantitative proteomics.

Keywords: proteomics, bioinformatics, cell response, mass spectrometry

УДК 577.17

ПРЯМОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ГЛЮКАГОН-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1-го ТИПА, ЛИРАГЛУТИДА, НА ЗРЕЛЫЕ АДИПОЦИТЫ РЕАЛИЗУЕТСЯ ЧЕРЕЗ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА-ЗАВИСИМОЕ УСИЛЕНИЕ ИНСУЛИНОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ*

© 2021 Е.Д. Мамонтова^{1,2,3}, С.С. Мичурина^{1,2}, Ю.С. Стафеев^{2**}, Е.Л. Соркина³,
И.А. Склиник³, Е.О. Кокшарова³, М.Ю. Меньшиков², М.В. Шестакова³, Е.В. Парфёнова^{2,4}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

² Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии Минздрава России,
121552 Москва, Россия; электронная почта: yuristafeev@gmail.com

³ Институт диабета, НМИЦ эндокринологии Минздрава России, 117036 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.11.2020

После доработки 07.12.2020

Принята к публикации 07.12.2020

Аналоги инкретиновых гормонов, в том числе глюкагон-подобного пептида 1-типа (ГПП-1), обладают сочетанным сахароснижающим, анорексигенным и кардиопротективным действиями. Механизмы действия ГПП-1 и его аналогов хорошо изучены для β -клеток поджелудочной железы, гепатоцитов и других типов тканей. Тем не менее эффекты ГПП-1 и его аналогов при локальном действии в жировой ткани в настоящий момент остаются неясными. В нашей работе мы провели оценку локального действия синтетического аналога ГПП-1, лираглутида, на адипогенную дифференцировку и инсулиновую чувствительность адипоцитов 3T3-L1. В ходе выполнения работы проводили белую и бежевую адипогенные дифференцировки преадипоцитов 3T3-L1 в течение 10 дней в присутствии/отсутствии 100 нМ лираглутида. Результат оценивали, определяя среднее число адипоцитов в поле зрения и поглощение экстракта красителя OilRedO. Затем в зрелых адипоцитах методом иммуноблоттинга оценивали зависимость активации и экспрессии киназ Erk и JNK от времени инкубации в присутствии лираглутида. Для уточнения механизма действия лираглутида зрелые адипоциты обрабатывали ингибитором аденилатциклазы SQ22536. В дальнейшем проводили оценку инсулиновой чувствительности клеток методами иммуноблоттинга и оценки инсулин-зависимого захвата глюкозы. В работе выявлено отсутствие значимого влияния лираглутида на бежевую адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1, при этом в составе белых адипоцитов лираглутид достоверно повышал экспрессию UCP-1. Исследование процессов активации промитогенной киназы Erk и провоспалительной киназы JNK при действии лираглутида продемонстрировало стимуляцию экспрессии киназы Erk и отсутствие эффектов на экспрессию киназы JNK. Добавление к клеткам одновременно с лираглутидом ингибитора аденилатциклазы SQ22536 вызывало подавление экспрессии Erk и активацию экспрессии JNK, что свидетельствует об участии аденилатциклазы в промитогенном и противовоспалительном эффектах лираглутида. Лираглутид стимулировал экспрессию субстрата инсулинового рецептора IRS-1 и киназы Akt, а также усиливал захват глюкозы клетками и экспрессию инсулин-зависимого глюкозного транспортера GLUT4; все эти эффекты нивелировались в присутствии SQ22536. В данной работе продемонстрировано усиление инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов синтетическим аналогом ГПП-1 лираглутидом, опосредуемое аденилатциклазой. Лираглутид не оказывал значимого воздействия на процесс бежевого адипогенеза, однако в составе белых адипоцитов усиливал экспрессию UCP-1. Полученные результаты свидетельствуют о позитивном инсулин-сенситизирующем прямом эффекте лираглутида на зрелые адипоциты, не связанном с формированием новых адипоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инсулиновая резистентность, адипоцит, глюкагон-подобный пептид 1-го типа, инкретины.

DOI: 10.31857/S032097252103009X

Принятые сокращения: ГПП-1 – глюкагон-подобный пептид 1 типа; ИР – инсулиновая резистентность; СД2Т – сахарный диабет 2-го типа; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; CREB – белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент (cAMP responsive element binding protein); Erk – киназа, регулируемая внеклеточными стимулами (extracellular signal regulated kinase); GLUT4 – глюкозный транспортер 4-типа; IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора типа 1; JNK – N-концевая киназа фактора c-Jun (c-Jun NH₂-terminal kinase), N-концевая киназа фактора c-Jun; SQ22536 – ингибитор аденилатциклазы, UCP-1 – разобщающий белок 1-го типа (uncoupling protein type 1); PKA – протеинкиназа A (protein kinase A, cAMP-dependent protein kinase); PPARgamma – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (peroxisome proliferator-activated receptor type gamma); RIPA – осаждающий буфер для радиоиммунного анализа (radioimmunoassay precipitation buffer).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-312, 08.03.2021.

** Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение является одним из наиболее распространённых заболеваний в мире, а также фактором риска развития инсулиновой резистентности (ИР) и сахарного диабета 2-го типа (СД2Т) [1–2] и связано, прежде всего, с увеличением объема жировой ткани. Ожирение и СД2Т увеличивают риск развития и тяжесть течения онкологических [3], сердечно-сосудистых [4] и многих других заболеваний. Изучение механизмов регуляции физиологии жировой ткани является важной научно-медицинской задачей.

Одной из наиболее новых и перспективных групп препаратов для коррекции СД2Т является группа глюкагон-подобного пептида 1-го типа (ГПП-1) и его аналогов. Физиологически, ГПП-1 представляет собой пептид, относящийся к семейству инкретиновых гормонов. Он образуется в результате ограниченного протеолиза проглюкагона в L-клетках тонкого кишечника [5]. Свободный ГПП-1 быстро деградирует в кровотоке под действием дипептидилпептидазы-4, время его полужизни составляет 1–2 минуты [6], поэтому в терапии СД2Т используют его синтетические аналоги. Лираглутид является синтетическим аналогом ГПП-1 и содержит несколько модификаций, которые не снижают его специфичность к рецептору глюкагон-подобного пептида 1-го типа. Увеличенное время полужизни лираглутида в крови составляет 13 часов [7].

ГПП-1 и препараты на основе других инкретиновых гормонов являются группой препаратов, для которых показано сочетание метаболического и кардиопротективного действия в терапии СД2Т. Существует мнение о том, что препараты на основе инкретиновых гормонов, в том числе аналоги ГПП-1, являются не столько антидиабетическими, сколько кардиопротективными препаратами с антидиабетическим эффектом [8–9]. ГПП-1 и его аналоги проявляют способность к снижению частоты развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, таких как ишемический инсульт, инфаркт миокарда и острый коронарный синдром [10]. Недавно также было показано, что ГПП-1 способствуют увеличению эндогенной антиоксидантной защиты, ингибированию апоптоза кардиомиоцитов, ослаблению эндотелиального воспаления и дисфункций [11].

Наиболее изученным механизмом действия ГПП-1 является влияние на β -клетки поджелудочной железы, проявляющееся в виде ГТФ-связывающего белок-зависимого экзоцитоза везикул инсулина, который происходит за счёт ак-

тивации аденилатциклазы и продукции циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), активирующей кальциевую сигнализацию [12]. Несмотря на наличие существенных данных о системных эффектах ГПП-1 на поджелудочную железу, центральную нервную и сердечно-сосудистую системы [13–14], данных о механизмах действия ГПП-1 и его аналогов на жировую ткань существует немного. Также особый интерес вызывает то, что терапия с помощью лираглутида и аналогов ГПП-1 зачастую проводится путем введения препарата в подкожную жировую клетчатку, что вызывает интерес к локальному действию вводимого препарата как на процессы обновления, так и на процессы дифференцировки клеток-предшественников адипоцитов. Известно, что ГПП-1 воздействует на жировую ткань, способствуя захвату и запасанию глюкозы [15]. На данный момент существует два потенциальных механизма действия лираглутида на жировую ткань, которые достаточно сильно различаются. С одной стороны, ГПП-1 способствует активации как белой, так и бежевой адипогенных дифференцировок [16–17]. Другие данные демонстрируют способность ГПП-1 стимулировать активность аденилатциклазы и продукции цАМФ с дальнейшей активацией зависимого от протеинкиназы А (РКА) липолиза [18].

В нашей работе мы изучили действие синтетического аналога ГПП-1, лираглутида, на процессы формирования новых адипоцитов (оценка активности бежевой и белой адипогенных дифференцировок преадипоцитов 3T3-L1), на воспалительный статус зрелых адипоцитов (активность N-концевой киназы фактора c-Jun (JNK)), а также на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общий дизайн исследования. Работу проводили на модели культивируемых преадипоцитов 3T3-L1. Для изучения процессов белой и бежевой адипогенной дифференцировки преадипоциты подвергали обработке соответствующими индукционными смесями в присутствии/отсутствии лираглутида. Для оценки эффективности дифференцировки вычисляли среднее число зрелых адипоцитов на единицу площади, проводили экстракцию сорбированного красителя OilRedO, измеряли уровень экспрессии белых/бежевых адипогенных маркеров с помощью иммуноблоттинга.

В дальнейшем проводили оценку кинетики фосфорилирования провоспалительной JNK и

промитогенной Erk (киназа, регулируемая внеклеточными стимулами) киназ при обработке зрелых адипоцитов лираглутидом в концентрации 100 нМ в течение 30 мин, 1, 6, 18 и 24 ч, а также в сочетании с ингибитором аденилатциклазы (SQ22536) в концентрации 500 мкМ с последующей оценкой инсулиновой чувствительности адипоцитов.

Для оценки инсулиновой чувствительности проводили обработку зрелых адипоцитов 3T3-L1 лираглутидом в течение 24 ч, после чего проводили оценку фосфорилирования и экспрессии основных участников инсулиновой сигнализации (субстрата инсулинового рецептора типа 1 (IRS-1) и киназы Akt) методом иммуноблоттинга, а также инсулин-стимулируемого захвата [^3H]-2-дезоксиглюкозы.

Материалы. Для культивирования мышечных преадипоцитов 3T3-L1 («ATCC», США) использовали культуральную среду DMEM-F12 (концентрация глюкозы 4,5 г/литр) («Gibco», США), содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки («HyClone», США) и 60 ед./мл смеси пенициллин/стрептомицин («Gibco», США). Преадипоциты 3T3-L1 дифференцировали с использованием инсулина, изобутилметилксантина, дексаметазона, розиглитазона, трийодтиронина и изопротеренола («Sigma Aldrich», США). Адипоциты инкубировали с синтетическим аналогом ГПП-1, лираглутидом («Selleckchem», Германия) и ингибитором аденилатциклазы, SQ22536 («Fluka», Germany). Для иммуноблоттинга использовали первичные антитела к pJNK1/2-T183/Y185 («R&D», США), tJNK1/2 («R&D», США), pErk1/2-T202/Y204 («Cell Signaling», США), tErk1/2 («Cell Signaling», США), UCP-1 («Thermo Scientific», США), PPARgamma («Cell Signaling», США), pIRS-Y612 («Thermo Scientific», США), tIRS («Cell Signaling», США), pAkt-S473 («Cell Signaling», США), tAkt («Abcam», США), GLUT4 («Abcam», США), beta-actin («Abcam», США) и вторичные антитела к IgG кролика/мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена («Abcam», США). Для оценки инсулин-индуцируемого захвата [^3H]-2-дезоксиглюкозы использовали растворы 2-дезоксиглюкозы («Sigma Aldrich», США) и [^3H]-2-дезоксиглюкозы («Perkin Elmer», США). Клеточный лизат образца растворяли в сцинтилляционной жидкости UltimaGold («Perkin Elmer», США), и измеряли количества распадов в образце на счётчике LKB RackBeta («LKB», Швеция). Для измерения концентрации белка использовали набор реактивов с использованием бицинхониновой кислоты «Pierce BCA Protein Assay Kit» («Thermo Scientific», США).

Культивирование и дифференцировка преадипоцитов 3T3-L1. Преадипоциты клеточной линии 3T3-L1 культивировали в среде DMEM-F12 (4,5 г/литр глюкозы), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 60 ед./литр смеси пенициллин/стрептомицин.

Белую адипогенную дифференцировку проводили по протоколу Zebisch et al. [19] с изменениями. Клетки культивировали до конfluence ~100%, держали в плотном конfluence в течение 2 дней, после чего следующие 4 дня среду заменяли на среду DMEM, содержащую 10% FBS, 0,5 мМ дексаметазона, 0,25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона, 100 нМ инсулина. Затем среду заменяли на стандартную среду культивирования на 2–4 дня и использовали культуру адипоцитов для экспериментов. Для оценки уровня накопления липидов использовали окраску липофильным красителем OilRedO («Merck Millipore», Германия). Результат окрашивания снимали в 4-х случайных полях зрения на микроскопе AxioVertA1 («Zeiss», Германия) в режиме фазово-контрастной микроскопии с последующим вычислением числа зрелых адипоцитов на единицу площади. Экстракцию красителя OilRedO из окрашенных адипоцитов проводили с использованием 100% изопропанола, поглощение экстракта оценивали на планшетном спектрофотометре Multiscan Microplate Reader («Labsystems», США).

Бежевую адипогенную дифференцировку проводили по протоколу Miller et al. [20] с изменениями. Клетки культивировали до конfluence ~100%, держали в плотном конfluence в течение 2 дней, после чего следующие 4 дня среду заменяли на среду DMEM, содержащую 10% FBS, 0,5 мМ дексаметазона, 0,25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона, 100 нМ инсулина, 1 нМ трийодтиронина и 100 мкМ изопротеренола. Затем среду заменяли на стандартную среду культивирования на 2–4 дня и использовали культуру адипоцитов для экспериментов.

Оценка уровня фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации зрелых адипоцитов 3T3-L1. Для оценки уровня фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации проводили депривацию зрелых адипоцитов в течение 4 ч в бессывороточной среде DMEM-F12. Затем обрабатывали клетки 100 нМ инсулина в течение 20 мин, после чего лизировали клетки в осаждающем буфере для радиоиммунного анализа (RIPA) (150 мМ NaCl, 1% (w/v) Triton-X100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, 50 мМ Tris-HCl при pH 8,0) с ингибиторами протеаз и фосфатаз («Roche», Швеция). Клеточные лиза-

ты гомогенизировали инсулиновым шприцем с диаметром иглы 29G.

Инсулин-индуцируемый захват [^3H]-2-дезоксиглюкозы. Для оценки инсулин-индуцируемого захвата глюкозы зрелые адипоциты 3T3-L1 стимулировали инсулином в концентрации 100 нМ в течение 20 минут, после чего в среду добавляли раствор, содержащий 100 мкМ 2-дезоксиглюкозы и 0,5 мкКи [^3H]-2-дезоксиглюкозы, на 5 мин. Клетки трижды отмывали холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали их с помощью буфера RIPA. Клеточный лизат растворяли в сцинтилляционной жидкости и измеряли количество распадов в образце на счетчике β -излучения.

Изучение действия лираглутида на активность промитогенных и провоспалительных киназ Erk и JNK. В дальнейшей работе проводили измерение зависимости уровней фосфорилирования и экспрессии промитогенной киназы Erk и провоспалительной киназы JNK от времени инкубации в присутствии 100 нМ лираглутида. Зрелые адипоциты 3T3-L1 депривировали в бессывороточной среде DMEM-F12 в течение 4 ч, после чего стимулировали лираглутидом в течение 30 мин, 1, 6, 18 и 24 ч. После стимуляции проводили лизис клеток в буфере RIPA с последующим анализом методом иммуноблоттинга. Для изучения механизма экспрессионных эффектов лираглутида на зрелые адипоциты 3T3-L1 проводили инкубацию в присутствии ингибитора аденилатциклазы SQ22536. Перед экспериментом также проводили депривацию клеток, как описано выше, с последующим добавлением вместе с лираглутидом ингибитора аденилатциклазы SQ22536 до концентрации 500 мкМ.

Иммуноблоттинг. Клеточные лизаты разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли в 10%-ном полиакриламидном геле [21]. Электроперенос белков проводили на поливинилиденфторидные мембраны («Amersham», США) методом мокрого переноса согласно инструкции производителя. Мембраны блокировали в течение 6 ч в 50 мМ Tris-HCl при pH 8,0, содержащем 5% обезжиренного молока («Applichem», Германия) с добавлением 0,1% (v/v) Tween 20, после чего инкубировали с первичными антителами согласно инструкции производителя. В дальнейшем мембраны обрабатывали вторичными антителами согласно инструкции производителя. Визуализацию хемилюминесценции осуществляли с использованием набора реактивов Clarity ECL («Bio-Rad», США) и регистрировали сигнал с помощью гель-документирующей системы FusionX («Vilber-Lourmat», Франция). Полученные изображения обрабатывали с помощью

программ ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) и GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). В дальнейшем вычисляли значение отношения фосфорилированной формы белка к общему количеству этого белка либо нормировали общее количество белка на белок эндогенного контроля β -актин.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Для каждой экспериментальной точки выполняли три независимых клеточных повтора, каждый из которых анализировали в трех репликатах. Для расчёта достоверности различий использовали t -критерий Стьюдента, принимая достоверными различия с вероятностью $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лираглутид не оказывает значимого влияния на бежевую дифференцировку, однако способствует росту экспрессии UCP-1 при белой дифференцировке преадипоцитов 3T3-L1. На первом этапе работы мы оценили воздействие синтетического аналога ГПП-1 лираглутида на процессы белой и бежевой адипогенных дифференцировок. Постановка данной задачи связана с подкожным введением лираглутида в клинической практике и возможным локальным действием лираглутида на адипогенез в составе жировой ткани. Эксперименты проводили в присутствии лираглутида в концентрации 100 нМ в индукционных смесях и средах культивирования после индукции (см. раздел «Материалы и Методы»).

Для оценки уровня дифференцировки преадипоцитов 3T3-L1 проводили окрашивание клеток после дифференцировки в присутствии/отсутствии лираглутида липофильным красителем OilRedO (рис. 1, а). Подсчет числа зрелых адипоцитов на единицу площади не продемонстрировал статистически значимых отличий между группами, однако при обработке белых и бежевых адипоцитов лираглутидом наблюдали статистически недостоверную тенденцию к увеличению числа адипоцитов в группах, подвергнутых обработке лираглутидом (рис. 1, б). Аналогичную ситуацию наблюдали и при оценке поглощения экстрактов красителя OilRedO — при обработке адипоцитов лираглутидом наблюдали небольшую тенденцию к росту поглощения экстрактов, в случае белой адипогенной дифференцировки эта разница была достоверна ($p = 0,004$), однако прирост поглощения после обработки лираглутидом составил менее 10% от общего значения (рис. 1, в). Полученные результаты ставят под сомнение нали-

тах 3T3-L1 после белой адипогенной дифференцировки.

Лираглутид усиливает экспрессию промитогенной киназы Erk и подавляет экспрессию провоспалительной киназы JNK за счёт активации аденилатциклазы. В ходе дальнейшей работы проводили оценку действия лираглутида на активацию и экспрессию промитогенной (Erk) и провоспалительной (JNK) киназ в зависимости от времени воздействия в зрелых белых адипоцитах 3T3-L1.

Анализ кинетики уровня фосфорилирования киназ Erk и JNK (рис. 2, а, б и в) продемонстрировал сходную картину транзитной активации (фосфорилирование Erk – $p = 0,04$ в интервале времени 0–0,5 ч; $p = 0,117$ в интервале времени 0,5–1 ч; и $p = 0,04$ в интервале времени 1–6 ч; в присутствии ингибитора аденилатциклазы (SQ22536) характер достоверности различий не изменялся). Анализ кинетики экспрессии киназы Erk продемонстрировал довольно сильную активацию экспрессии в ответ на действие лираглутида. Данный эффект наблюдался, начиная с 0,5 ч инкубации в присутствии лираглутида, что довольно мало для реализации экспрессионных эффектов. Тем не менее уровень экспрессии киназы Erk был статистически достоверно повышен в течение 6 ч инкубации в присутствии лираглутида, однако в интервале 18–24 ч уровень экспрессии киназы Erk вернулся к базовому значению (рис. 2, а и в). Экспрес-

сия киназы JNK достоверно не изменялась относительно контроля с течением времени в присутствии лираглутида (рис. 2, а и д). Таким образом, лираглутид обладает способностью к транзитной активации киназ Erk и JNK, которая сопровождается достаточно стабильным (до 6 ч) ростом экспрессии киназы Erk. В связи с этим мы предположили наличие разнонаправленных экспрессионных эффектов лираглутида на зрелые адипоциты 3T3-L1.

Основным транскрипционным фактором, задействованным в экспрессионных эффектах лираглутида, является фактор CREB (белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент), который активируется при повышении концентрации цАМФ в клетке [22–24]. Основным ферментом, производящим цАМФ в клетке и, кроме того, способным активировать транскрипционный фактор CREB, является аденилатциклаза. В дальнейшей работе для проверки механизма действия лираглутида использовали ингибитор аденилатциклазы (SQ22536) до концентрации 500 мкМ [25–27].

Анализ кинетики уровня фосфорилирования киназ Erk и JNK под действием лираглутида в присутствии SQ22536 продемонстрировал аналогичный транзитный ответ. В случае JNK мы наблюдаем рост активационного фосфорилирования киназы в точке 24 ч относительно того же уровня в присутствии SQ22536 (рис. 2, а, б и в). SQ22536 полностью подавлял активацию

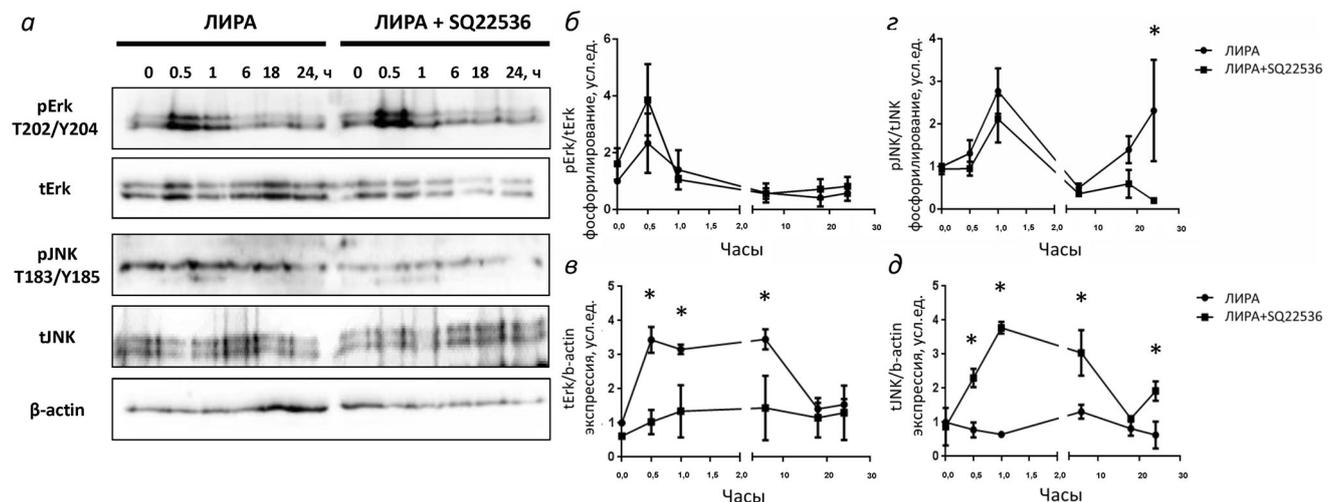


Рис. 2. Лираглутид не оказывает значимого влияния на активацию сигнализации киназ Erk и JNK, однако влияет на их экспрессию через аденилатциклазу. а – Репрезентативные иммуноблоттинги; б – зависимость уровня фосфорилирования киназ pErk1/2-T202/Y204 от времени действия лираглутида; в – зависимость уровня экспрессии киназ Erk1/2 от времени действия лираглутида; г – зависимость уровня фосфорилирования киназ pJNK1/2-T183/Y185 от времени действия лираглутида; д – зависимость уровня экспрессии киназ tJNK1/2 от времени действия лираглутида. Все данные получены при использовании 100 нМ лираглутида ± 500 мкМ SQ22536. Представлены результаты трех независимых экспериментов, для расчёта достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, * $p < 0,05$, статистическая значимость рассчитана для каждой пары значений в одной временной точке (± 500 мкМ SQ22536)

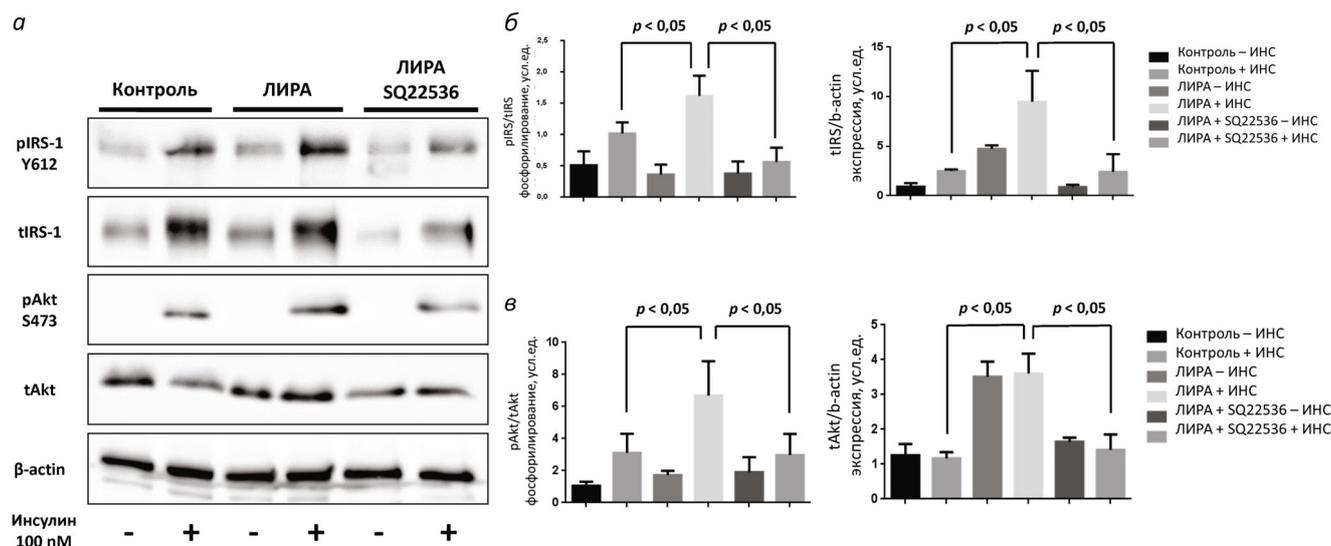


Рис. 3. Лираглутид усиливает фосфорилирование и экспрессию белков IRS-1 и Akt путём активации аденилатциклазы. Все данные представлены в присутствии 100 нМ лираглутида \pm 500 мкМ SQ22536. *a* – Репрезентативные иммуноблоттинги, *б* – результаты статистического анализа активации и экспрессии IRS-1, *в* – результаты статистического анализа активации и экспрессии Akt. В расчётах представлены результаты трех независимых экспериментов, для расчёта достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, результат считался статистически недостоверным при $p > 0,05$

экспрессии Erk лираглутидом при инкубации 0,5–6 ч. И, если лираглутид сам по себе не влиял на экспрессию JNK, в присутствии SQ22536 наблюдалась статистически достоверная активация экспрессии JNK (рис. 2, *a*, *в* и *д*). Данный результат указывает на разнонаправленную регуляцию экспрессии Erk и JNK, которая зависит от цАМФ, лираглутидом. Это позволяет предполагать возможность участия лираглутида в регуляции процессов пролиферации и воспаления клеток в составе жировой ткани.

Лираглутид усиливает фосфорилирование и экспрессию белков IRS-1 и Akt за счёт активации аденилатциклазы. Мы предположили, что, помимо регуляции процессов пролиферации и воспаления в жировой ткани, лираглутид может оказывать системное сахароснижающее действие за счёт повышения инсулиновой чувствительности адипоцитов при подкожном введении препарата.

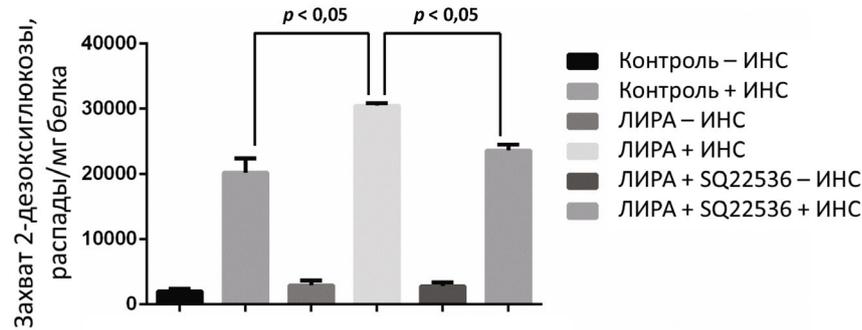
В ходе работы была показана стимуляция как фосфорилирования, так и экспрессии каркасного белка IRS-1, который способствует передаче сигнала инсулина от рецептора к внутриклеточным киназам (рис. 3, *a* и *б*), а также киназы Akt при прямом действии лираглутида на зрелые адипоциты (рис. 3, *a* и *в*). Стоит отметить, что уровень базального фосфорилирования протеинкиназы Akt при действии лираглутида практически не изменяется, что в сочетании с усилением экспрессии Akt при действии лираглутида может свидетельствовать об умень-

шении степени фосфорилирования Akt при действии лираглутида без стимуляции инсулином (рис. 3, *a* и *в*). SQ22536 способствует полному исчезновению эффектов лираглутида и возврату значений уровня фосфорилирования и экспрессии белков IRS-1 и Akt к базальным показателям (рис. 3, *a* и *б*). Полученные результаты демонстрируют стимулирующее действие лираглутида на работу инсулин-зависимой сигнализации, что позволяет предполагать ассоциированные изменения в процессе инсулин-зависимого захвата глюкозы.

Лираглутид усиливает инсулин-стимулируемый захват глюкозы зрелыми адипоцитами 3T3-L1 по аденилатциклаза-зависимому механизму. После оценки активности инсулиновой сигнализации мы перешли к изучению физиологического ответа зрелых адипоцитов 3T3-L1 на действие инсулина. Реальным физиологическим ответом адипоцитов на инсулин является скорость поглощения глюкозы.

В зрелых адипоцитах 3T3-L1 инсулин стимулирует захват глюкозы адипоцитами примерно в 9,5 раз относительно контроля, в то время как в присутствии лираглутида стимуляция увеличивается (до 11 раз). Стоит отметить, что в абсолютных значениях захват глюкозы при действии инсулина в присутствии лираглутида увеличивается на 30% относительно аналогичного показателя в отсутствие лираглутида ($p = 0,023$, рис. 4, *a*). Добавление SQ22536 полностью снимает эффект лираглутида ($p = 0,01$,

а



б

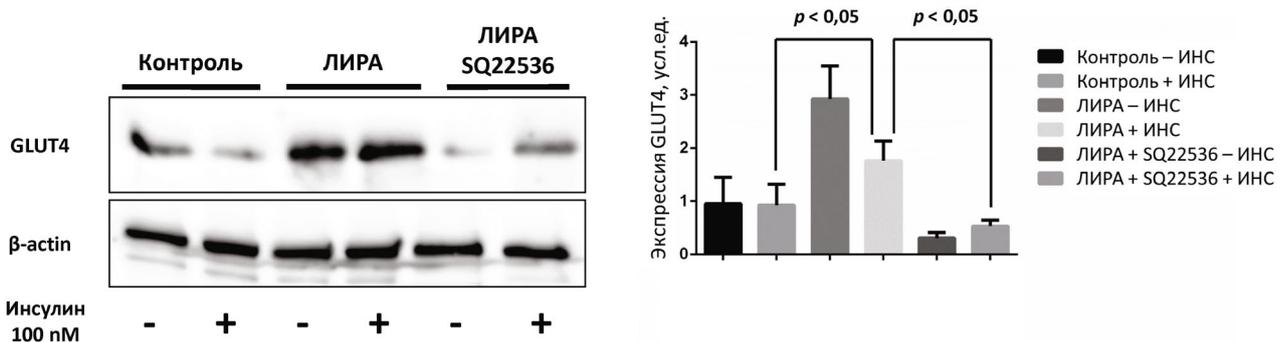


Рис. 4. Лираглутид усиливает инсулин-зависимый захват глюкозы путём регуляции экспрессии инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4 при участии аденилатциклазы. Все данные представлены в присутствии 100 нМ лираглутида \pm 500 мкМ SQ22536. *а* – Гистограмма инсулин-стимулируемого захвата [3H]-2-дезоксиглюкозы, *б* – репрезентативный иммуноблоттинг и гистограмма денситометрии иммуноблоттинга. В расчётах представлены результаты трех независимых экспериментов, для расчёта достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, результат считался статистически недостоверным при $p > 0,05$

рис. 4, *а*), при этом в абсолютных значениях захват глюкозы при действии инсулина в контроле и в присутствии лираглутида с SQ22536 статистически не различаются (рис. 4, *а*). В качестве выяснения возможных механизмов усиления инсулиновой чувствительности адипоцитов при действии лираглутида в ходе работы проводили оценку экспрессии инсулин-зависимого транспортера глюкозы 4-го типа (GLUT4). Было показано существенное усиление экспрессии GLUT4 при действии лираглутида, при этом эффект лираглутида на экспрессию GLUT4 полностью нивелировался в присутствии SQ22536 (рис. 4, *б*). Стоит отметить, что в присутствии лираглутида добавление к клеткам инсулина снижает экспрессию GLUT4 относительно не стимулированных инсулином клеток, но не относительно контрольных клеток или действия ингибитора. Данный факт может быть связан с чрезвычайно плеiotропным действием лираглутида на адипоциты. Суммируя полученные результаты, мы можем предположить, что лираглутид способствует улучшению инсулиновой чувствительности адипоцитов, причем данные

эффекты реализуются по аденилатциклаза-зависимому механизму.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы продемонстрировали эффекты, связанные с прямым действием синтетического аналога ГПП-1 лираглутида на преадипоциты и зрелые адипоциты 3T3-L1. В концентрации 100 нМ лираглутид существенно не изменял способность преадипоцитов к адипогенной дифференцировке, усиливая, однако, экспрессию UCP-1 в белых адипоцитах и коммитируя их в направлении бежевой дифференцировки. Лираглутид способен разнонаправленно регулировать экспрессию промитогенной киназы Erk и провоспалительной киназы JNK в зрелых адипоцитах по аденилатциклаза-зависимому механизму. Также лираглутид продемонстрировал потенциал к усилению экспрессии ряда участников инсулиновой сигнализации и инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4 по аденилатциклаза-зависимому меха-

низму. Лираглутид стимулирует инсулин-зависимый захват глюкозы, причем это также происходит при участии аденилатциклазы (рис. 5).

Основная функция ГПП-1 заключается в реализации инсулинотропного эффекта в ответ на приём пищи – при действии ГПП-1 происходит стимуляция секреции инсулина, а также подавление секреции глюкагона через активацию специфического рецептора ГПП-1. Инсулинотропный эффект в сочетании с другими быстрыми эффектами ГПП-1 способствует снижению уровня глюкозы крови [28–30]. Таким образом, можно заключить, что ГПП-1 является «усилителем», который дополнительно стимулирует

постпрандиальную секрецию инсулина, вызывая максимальную активацию захвата глюкозы клетками. Тем не менее у пациентов с ИР и СД2Т наблюдается снижение ГПП-1 и общее изменение профиля секреции инкретиновых гормонов [31–33]. Именно поэтому разработка терапевтического подхода к коррекции ИР и СД2Т на основе использования аналогов ГПП-1 и других инкретиновых гормонов получила такое развитие в начале XXI века [34–35]. В настоящее время наиболее распространенными препаратами на основе аналогов ГПП-1 являются препараты на основе лираглутида – синтетического аналога ГПП-1. Введение большинства препаратов на

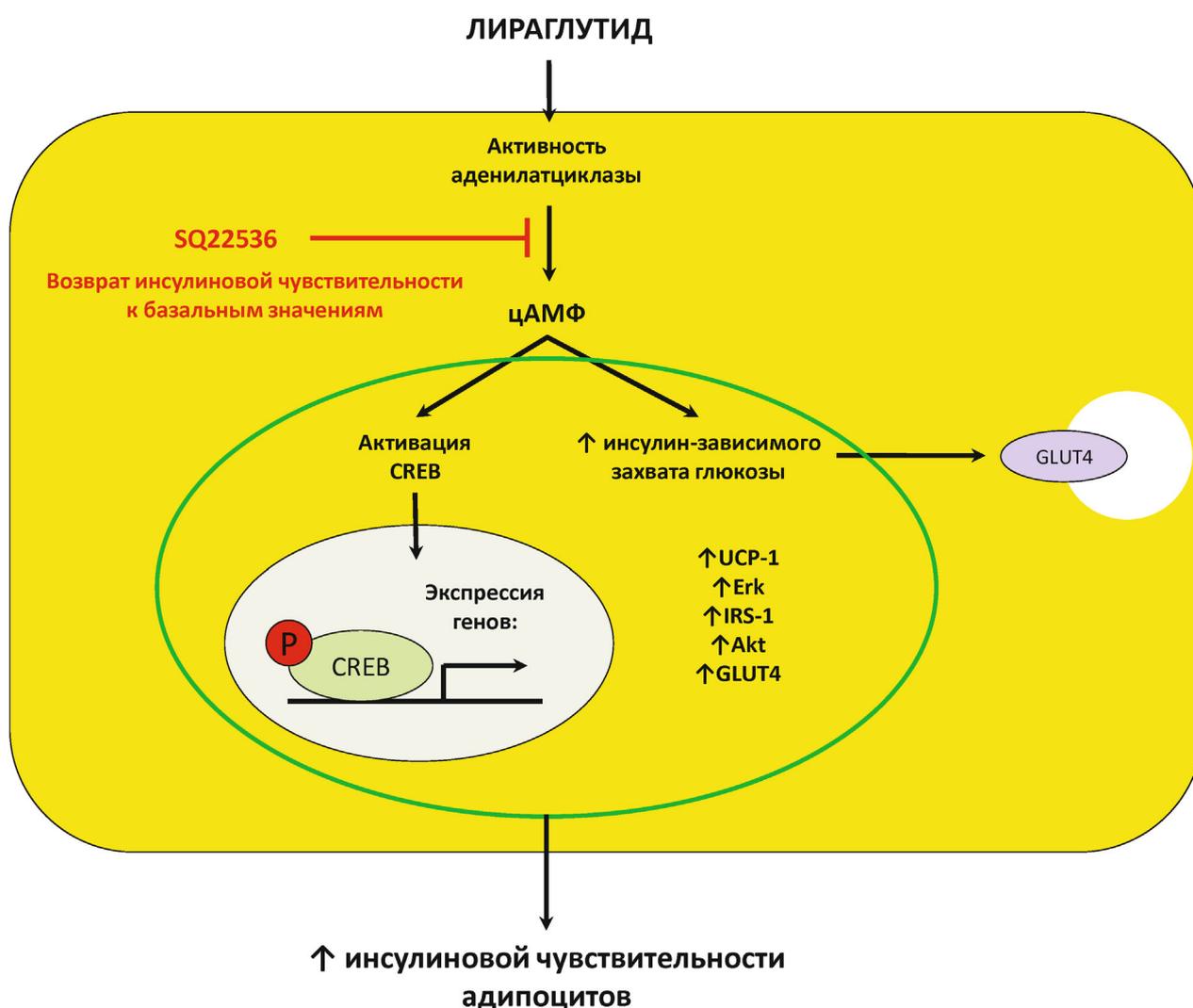


Рис. 5. Возможный механизм прямого действия лираглутида на зрелые адипоциты связан с регуляцией активности аденилатциклазы, которая через активацию транскрипционного фактора CREB способна оказывать эффекты на экспрессию важнейших участников процессов термогенеза (UCP-1), воспаления (JNK), пролиферации и выживаемости (Erk), а также инсулиновой чувствительности (IRS-1, Akt и GLUT4). Сокращения и аббревиатуры: Akt – протеинкиназа B; cAMP – цАМФ; CREB – белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент; Erk – киназа, регулируемая внеклеточными стимулами; GLUT4 – транспортер глюкозы 4-го типа; IRS – субстрат инсулинового рецептора; JNK – N-концевая киназа фактора c-Jun; SQ22536 – ингибитор аденилатциклазы; UCP-1 – разобщающий белок 1-го типа

основе аналогов ГПП-1 происходит в подкожную жировую клетчатку, регуляция образования которой является важнейшей проблемой в контексте вопросов ожирения и СД2Т.

В настоящее время вопрос взаимодействия ГПП-1 и жировой ткани хорошо изучен с точки зрения центральных механизмов регуляции. ГПП-1 способен модулировать активность гипоталамо-гипофизарной системы и влиять на метаболизм жировой ткани, стимулируя биогенез бежевого жира [36–38]. Тем не менее в одном из последних исследований механизмов эффективности бариатрической хирургии была показана роль именно локальной экспрессии рецептора ГПП-1 в подкожной жировой ткани в процессе улучшения метаболических параметров пациентов с ожирением и СД2Т после бариатрических хирургических вмешательств [39]. Таким образом, можно предполагать, что локальное действие ГПП-1 и его аналогов способно улучшать метаболический профиль и инсулиновую чувствительность. В нашей работе мы попытались прояснить механизмы локального действия ГПП-1 (в лице его синтетического аналога лираглутида) на процессы белой и бежевой адипогенной дифференцировки.

Первой нашей находкой было отсутствие очевидного эффекта лираглутида на процессы белой адипогенной дифференцировки, что сочеталось с усилением экспрессии UCP-1 в составе белых адипоцитов под действием лираглутида. Ранее не было продемонстрировано убедительного локального эффекта ГПП-1 на активацию бежевой адипогенной дифференцировки, поэтому наши результаты в этой области являются новыми. Известно, что ключевым фактором в регуляции биогенеза бежевой жировой ткани при системном действии лираглутида является ответ гипоталамо-гипофизарной системы, который способен регулировать термогенез [36–38]. Тем не менее некоторые работы показывают активацию белой адипогенной дифференцировки преадипоцитов 3T3-L1 в ответ на действие лираглутида и ГПП-1 [16–17]. Стоит отметить тот факт, что данные работы выполнены в несколько иной модели адипогенной дифференцировки, которая не включает в себя использование розиглитазона. Использование розиглитазона способствует сильной индукции адипогенной дифференцировки и может нивелировать возможный эффект лираглутида на белый адипогенез. В рамках обсуждения отсутствия эффекта лираглутида на экспрессию UCP-1 в условиях бежевой адипогенной дифференцировки можно предположить максимальный эффект индукционной среды для бежевых адипоцитов в повышении экспрессии UCP-1, и

наблюдаемый уровень экспрессии является максимальным для данных условий.

Переходя к обсуждению экспрессионных эффектов локального действия лираглутида на киназы Erk и JNK (рис. 5), стоит отметить возможное локальное промитогенное и защитное (pro-survival) действие (Erk) и противовоспалительное действие (JNK) лираглутида. Действительно, в некоторых работах отмечается промитогенное действие лираглутида и ГПП-1 через активацию киназы Erk, данный эффект прослежен на различных типах клеток [40–41]. Существуют данные и о противовоспалительном действии лираглутида и ГПП-1, однако эти данные получены на животных моделях. Было продемонстрировано, что нативный ГПП-1 при гиперэкспрессии в жировой ткани снижает степень ожирения и инфильтрации жировой ткани макрофагами, а также способствует противовоспалительной поляризации макрофагов [42–43]. Однако стоит понимать, что в данных работах речь идет скорее о системном действии лираглутида, первые данные о локальном противовоспалительном действии получены в нашей работе.

Несмотря на многие факты, указывающие на центральное действие ГПП-1 и его аналогов как на основной механизм регуляции гомеостаза жировой ткани, в нашей работе был отмечен очень существенный момент относительно прямого действия ГПП-1 на адипоциты. Лираглутид способен существенно активировать экспрессию участников инсулинового каскада и способствовать поглощению глюкозы подкожной жировой тканью. Данные результаты согласуются с работой Gao et al. [44], где была продемонстрирована регуляция инсулиновой сигнализации адипоцитов с помощью ГПП-1 через экспрессионные эффекты на инсулиновый рецептор, IRS-1 и инсулин-зависимый глюкозный транспортер GLUT4, однако находки, связанные с изменением инсулин-стимулированного захвата глюкозы, экспрессии GLUT4 и аденилатциклаза-зависимым характером данных изменений являются новыми.

В работе убедительно показан рост инсулин-зависимого поглощения глюкозы при прямом действии лираглутида на зрелые адипоциты 3T3-L1. Интересен вопрос о дальнейшей судьбе данной глюкозы. Согласно нашим результатам, глюкоза не трансформировалась напрямую в запасную форму энергии (в липиды), так как ни количество адипоцитов, ни суммарное содержание в них липидов не изменились (рис. 1, а–в). Возможным ответом может являться обнаруженный рост экспрессии UCP-1 – разобщающего белка митохондрий и основного участника процесса термогенеза, который способен сжи-

гать энергетические запасы клетки. Можно предположить, что повышение инсулин-зависимого поглощения глюкозы зрелыми адипоцитами 3T3-L1 в присутствии лираглутида связано с активацией процессов термогенеза и сжигания нутриентов под действием лираглутида.

Механизмы экспрессионных эффектов лираглутида на жировую ткань были исследованы в предыдущих работах, однако консенсусного мнения по данному вопросу в настоящее время не существует. Безусловно, центральным эффектором регуляции экспрессии в поджелудочной железе является транскрипционный фактор CREB [22–24]. В предыдущих работах был продемонстрирован трехкратный рост концентрации цАМФ в адипоцитах под влиянием ГПП-1, что косвенно подтверждает цАМФ-зависимый механизм действия ГПП-1 на адипоциты [18]. Также было продемонстрировано, что добавление ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы (PKA) блокирует ГПП-1-стимулируемые изменения экспрессии синтазы жирных кислот и активацию транскрипционного фактора CREB в составе зрелых адипоцитов 3T3-L1 [17]. Однако стоит отметить, что транскрипционный фактор CREB может работать не только как гомодимер, но и образуя активный гомодимер с транскрипционными факторами ATF, поэтому стоит понимать возможную вовлеченность других транскрипционных факторов семейства CREB/ATF в реализацию физиологических эффектов лираглутида [45]. Полученные нами данные о аденилатциклаза-зависимых экспрессионных эффектах лираглутида подтверждают участие аденилатциклаза-зависимого PKA-CREB сигнального каскада в реализации экспрессионных эффектов лираглутида при локальном действии на подкожную жировую ткань.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя результаты проделанной работы, следует отметить, что синтетический аналог ГПП-1 лираглутид оказывает позитивное прямое действие на зрелые адипоциты, стимулируя их инсулиновую чувствительность, а также обладая промитогенным и противовоспалительным действиями. Данные эффекты реализуются через аденилатциклазу и, по-видимому, через PKA–CREB сигнальный каскад. Синтетический аналог ГПП-1, лираглутид, не демонстрирует существенного прямого действия как на биогенез термогенных адипоцитов, так и на процесс биогенеза белых адипоцитов. Полученные результаты свидетельствуют о позитивном антидиабетическом локальном эффекте лираглутида, однако механизмы регуляции термогенеза и запасания липидов, по-видимому, реализуются в большей степени через системное действие лираглутида.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-75-00068), а также в рамках совместного Российско-Тайваньского проекта Российского Научного Фонда и Министерства науки и технологий Тайваня (проект № 20-45-08003).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olefsky, J. M., and Glass, C. K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 219–246.
2. Vorotnikov, A. V., Stafeev, I. S., Menshikov, M. Yu., Shestakova, M. V., and Parfyonova, Ye. V. (2019) Latent inflammation and defect in adipocyte renewal as a mechanism of obesity-associated insulin resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1329–1345.
3. Gallagher, E. J., and LeRoith, D. (2015) Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality, *Physiol. Rev.*, **95**, 727–748.
4. Booth, G. L., Kapral, M. K., Fung, K., and Tu, J. V. (2006) Recent trends in cardiovascular complications among men and women with and without diabetes, *Diabetes Care*, **29**, 32–37.
5. Mojsov, S., Weir, G. C., and Habener, J. F. (1987) Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7–37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas, *J. Clin. Invest.*, **79**, 616–619.
6. Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., and Holst, J. J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide 1 are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects, *Diabetes*, **44**, 1126–1131.
7. Jackson, S. H., Martin, T. S., Jones, J. D., Seal, D., and Emanuel, F. (2010) Liraglutide (victoza): the first once-daily incretin mimetic injection for type 2 diabetes, *P T*, **35**, 498–529.
8. Chou, C. Y., Chang, Y. T., Yang, J. L., Wang, J. Y., Lee, T. E., et al. (2017) Effect of long-term incretin-based therapies on ischemic heart diseases in patients with type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 15795.
9. Nathanson, D., Ullman, B., Löfström, U., Hedman, A., Frick, M., et al. (2012) Effects of intravenous exenatide in type 2 diabetic patients with congestive heart failure: a double-blind, randomised controlled clinical trial of efficacy and safety, *Diabetologia*, **55**, 926–35.

10. White, W. B., and Baker, W. L. (2016) Cardiovascular effects of incretin-based therapies, *Annu. Rev. Med.*, **67**, 245-60.
11. Erdogdu, O., Nathanson, D., Sjöholm, A., Nyström, T., and Zhang, Q. (2010) Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **325**, 26-35.
12. Ding, W. G., and Gromada, J. (1997) Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide, *Diabetes*, **46**, 615-621.
13. Knop, F. K., Visboll, T., and Holst, J. J. (2009) Incretin-based therapy of type 2 diabetes mellitus, *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **10**, 46-55.
14. Campbell, J. E., and Drucker, D. J. (2013) Pharmacology, physiology and mechanisms of incretin hormone action, *Cell. Metab.*, **17**, 819-837.
15. Young, A. A., Gedulin, B. R., Bhavsar, S., Bodkin, N., Jodka, C., et al. (1999) Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), *Diabetes*, **48**, 1026-1034.
16. Challa, T. D., Beaton, N., Arnold, M., Rudofsky, G., Langhans, W., and Wolfrum, C. (2012) Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6421-6430.
17. Chen, J., Zhao, H., Ma, X., Zhang, Y., Lu, S., et al. (2017) GLP-1/GLP-1R signaling in regulation of adipocyte differentiation and lipogenesis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **42**, 1165-1176.
18. Vendrell, J., Bekay, R. E., Peral, B., Garcia-Fuentes, E., Megia, A., et al. (2011) Study of the potential association of adipose tissue GLP-1 receptor with obesity and insulin resistance, *Endocrinology*, **152**, 4072-4079.
19. Zebisch, K., Voight, V., Wabitsch, M., and Brandsch, M. (2012) Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes, *Anal. Biochem.*, **425**, 8890.
20. Miller, C. N., Yang, J. Y., England, E., Yin, A., Baile, C. A., and Rayalam, S. (2015) Isoproterenol increases uncoupling, glycolysis, and markers of being in mature 3T3-L1 adipocytes, *PLoS One*, **10**, e0138344.
21. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **15**, 680-685.
22. Bao, Y., Jiang, L., Chen, H., Zou, J., Liu, Z., and Shi, Y. (2015) The neuroprotective effect of liraglutide is mediated by glucagon-like peptide 1 receptor-mediated activation of cAMP/PKA/CREB pathway, *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 2366-2378.
23. Kimura, T., Kaneto, H., Shimoda, M., Hirukawa, H., Okauchi, S., et al. (2015) Protective effects of pioglitazone and/or liraglutide on pancreatic β -cells in db/db mice: comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **400**, 78-89.
24. Que, Q., Guo, X., Zhan, L., Chen, S., Zhang, Z., et al. (2019) The GLP-1 agonist, liraglutide, ameliorates inflammation through the activation of the PKA/CREB pathway in a rat model of knee osteoarthritis, *J. Inflamm. (Lond)*, **16**, 13.
25. Haslam, R. J., Davidson, M. M., and Desjardins, J. V. (1978) Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP, *Biochem. J.*, **176**, 83-95.
26. Juan, C., Chang, C., Lai, Y., and Ho, L. (2005) Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288**, E1146-E1152.
27. Li, F., Wang, D., Zhou, Y., Zhou, B., Yang, Y., et al. (2008) Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Cell. Res.*, **18**, 311-323.
28. Wang, Q., and Brubaker, P. (2002) Glucagon-like peptide 1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice, *Diabetologia*, **45**, 1263-1273.
29. Willard, F. S., and Sloop, K. W. (2012) Physiology and emerging biochemistry of the glucagon-like peptide-1 receptor, *Exp. Diab. Res.*, **2012**, 470851.
30. Cho, Y. M., Fujita, Y., and Kieffer, T. J. (2014) Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond, *Annu. Rev. Physiol.*, **76**, 533-536.
31. Nauck, M. A., Vardarli, I., Deacon, C. F., Holst, J. J., and Meier, J. J. (2011) Secretion of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia*, **54**, 10-18.
32. Woerle, H. J., Carneiro, L., Derani, A., Goke, B., and Schirra, J. (2012) The role of endogenous incretin secretion as amplifier of glucose-stimulated insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes, *Diabetes*, **61**, 2349-2358.
33. Ahren, B. (2013) Incretin dysfunction in type 2 diabetes: clinical impact and future perspectives, *Diabetes. Metab.*, **39**, 195-201.
34. Peters, A. (2010) Incretin-based therapies: review of current clinical trial data, *Am. J. Med.*, **123**, S28-S37.
35. Drucker, D. J., Sherman, S. I., Gorelick, F. S., Bergenstal, R. M., Sherwin, R. S., and Buse, J. B. (2010) Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefit, *Diabetes Care*, **33**, 428-433.
36. Lockie, S. H., Heppner, K. M., Chaudhary, N., Chabenne, J. R., Morgan, D. A., et al. (2012) Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling, *Diabetes*, **61**, 2753-2762.
37. Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., et al. (2014) GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK, *Diabetes*, **63**, 3346-3358.
38. Kooijman, S., Wang, Y., Parlevliet, E.T., Boon, M.R., Edelschaap, D., et al. (2015) Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice, *Diabetologia*, **58**, 2637-2646.
39. Ejarque, M., Guerrero-Pérez, F., de la Morena, N., Casajoana, A., Virgili, N., et al. (2019) Role of adipose tissue GLP-1R expression in metabolic improvement after bariatric surgery in patients with type 2 diabetes, *Sci. Rep.*, **9**, 6274.
40. Quoyer, J., Longuet, C., Broca, C., Linck, N., Costes, S., et al. (2010) GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a β -arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic β -cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 1989-2002.
41. Li, Y., Tweedie, D., Mattson, M. P., Holloway, H. W., and Greig, N. H. (2010) Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells, *J. Neurochem.*, **113**, 1621-1631.
42. Shiraishi, D., Fujiwara, Y., Komohara, Y., Mizuta, H., and Takeya, M. (2012) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 304-308.
43. Lee, Y. S., Park, M. S., Choung, J. S., Kim, S. S., et al. (2012) Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes, *Diabetologia*, **55**, 2456-2468.
44. Gao, H., Wang, X., Zhang, Z., Yang, Y., Yang, J., et al. (2007) GLP-1 amplifies insulin signaling by up-regulation of IRbeta, IRS-1 and Glut4 in 3T3-L1 adipocytes, *Endocrine*, **32**, 90-95.
45. Hai, T., and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3720-3724.

**DIRECT ACTION OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE TYPE 1
SYNTHETIC ANALOGUE LIRAGLUTIDE REALIZES
THROUGH ADENYLATE-CYCLASE-DEPENDENT
ENHANCING OF INSULIN SENSITIVITY***

E. D. Mamontova^{1,2,3}, S. S. Michurina^{1,2}, I. S. Stafeev^{2}, E. L. Sorkina³, I. A. Sklyanik³,
E. O. Koksharova³, M. Y. Menshikov², M. V. Shestakova³, and Ye. V. Parfyonova^{2,4}**

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

² Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre for Cardiology,
121552 Moscow, Russia; E-mail: yuristafeev@gmail.com

³ Diabetes Institute, Endocrinology Research Centre, 117036 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Incretin hormones analogues, including glucagon-like peptide type 1 (GLP-1), have complex glucose-lowering, anorexigenic and cardioprotective action. Mechanisms of GLP-1 and its analogues action are well known for pancreatic β -cells, hepatocytes and other tissues. Nevertheless, effects of GLP-1 and its analogues during local action in adipose tissue remain unclear. In the present work we have performed the evaluation of GLP-1 synthetic analogue liraglutide on adipogenesis and insulin sensitivity of 3T3-L1 adipocytes. Methods: In our work we have performed white and beige adipogenic differentiations during 10 days with or without 100 nM of liraglutide. Differentiation results were estimated by phase contrast microscopy and optical density of OilRedO extract. Then activation and expression of kinases Erk and JNK were evaluated in dependent of incubation time with liraglutide by Western blotting. For further understanding of liraglutide action mature adipocytes treated by adenylate cyclase inhibitor SQ22536. Hereinafter we have estimated insulin sensitivity of mature adipocytes by Western blotting and insulin-dependent glucose uptake. Results: During our work we have shown the absence of any significant influences of liraglutide on beige adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. It's worth noting that in white adipocytes liraglutide statistically significant increases UCP-1 expression. The investigation of pro-mitogenic kinase Erk and pro-inflammatory kinase JNK activities during liraglutide action has shown stimulation of Erk activation with absence of any effects on JNK activation. Simultaneous treatment of cells by liraglutide and adenylate cyclase inhibitor SQ22536 has caused suppression of Erk expression and activation of JNK expression which testify about adenylate cyclase participation in pro-mitogenic and anti-inflammatory liraglutide actions. Liraglutide stimulates expression of insulin receptor substrate IRS-1 and Akt kinase and also enhances glucose uptake by adipocytes and GLUT4 expression. All these effects were resolved under SQ22536 treatment. Conclusions: In present work it has shown enhancing of insulin sensitivity of mature adipocytes by GLP-1 synthetic analogue liraglutide which was mediated by adenylate cyclase. Liraglutide have not shown any significant action on beige adipogenesis, but have enhanced UCP-1 expression in white adipocytes. Obtained results testify about positive insulin-sensitizing direct effect of liraglutide on mature adipocytes.

Keywords: insulin resistance, adipocyte, GLP-1, incretins

УДК 577.152.1

ХАРАКТЕРИСТИКА КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЛАВОЦИТОХРОМ *c* СУЛЬФИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thioalkalivibrio paradoxus**

© 2021 Т.В. Тихонова**, А.В. Лильина, Е.М. Осипов, Н.С. Шипков,
Н.И. Дергоусова, О.Г. Куликова, В.О. Попов

Федеральный исследовательский центр биотехнологии РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: ttikhonova@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.09.2020

После доработки 23.11.2020

Принята к публикации 23.11.2020

Флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа (FCC) считается одним из основных ферментов дыхательного цикла сероокисляющих бактерий. FCC катализирует окисление сульфид- и полисульфид-ионов до молекулярной серы с переносом электронов на цитохром *c*. Каталитически активная форма фермента представляет собой нековалентно связанный гетеродимер, состоящий из FAD- и гем-связывающих субъединиц. В геноме бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* обнаружено 5 копий генов гомологичных FCC со степенью идентичности аминокислотных последовательностей 54–36%. При росте бактерии на тиоцианате или тиосульфате как основных источниках энергии синтезируются продукты разных копий генов FCC. В настоящей работе выделена и охарактеризована FCC, которая синтезируется при росте *Tv. paradoxus* на тиоцианате. Показано, что FCC окисляет сульфид и не окисляет другие восстановленные соединения серы, такие как тиосульфат, сульфит, тетраионат и молекулярную серу, а также не катализирует обратную реакцию восстановления серы до сульфида. Охарактеризованы кинетические параметры реакции окисления сульфид-иона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сероокисляющие бактерии, флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа, тиоцианатдегидрогеназа, ферментативная кинетика.

DOI: 10.31857/S0320972521030106

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные сероокисляющие γ -протеобактерии рода *Thioalkalivibrio* являются галоалкалофильными облигатными автотрофами, обитающими в содовых озерах Африки, Центральной Азии и Северной Америки [1–4]. Микробные сообщества этих озер приспособились к росту в экстремальных условиях щелочных pH (до 11) и высоких концентраций соли (до 4 М Na⁺). Основным источником энергии для литотрофных микробных сообществ в содовых озерах является окисление восстановленных соединений серы, таких как тиосульфат, сульфид, полисульфид и молекулярная сера [1].

Принятые сокращения: MM – молекулярная масса; *SutC* – цитохром *c* из сердца лошади; FCC – флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа; TcDH – тиоцианатдегидрогеназа; TrFCC – флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1; SQR – сульфид : хиноноксидоредуктаза.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-320, 08.03.2021.

** Адресат для корреспонденции.

Десять из 85 штаммов *Thioalkalivibrio*, обитающих в содовых озерах, способны расти на тиоцианате (SCN⁻) как единственном источнике энергии [2, 5]. Наиболее исследованные из них – *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1, *Thioalkalivibrio nitratireducens* ALEN 2 и *Thioalkalivibrio thio-cyanoxidans* ARh 2T [6–11]. На рис. 1 представлены основные пути метаболизма соединений серы в энергетическом цикле бактерий рода *Thioalkalivibrio*, основанные на анализе геномов и транскриптомов бактерий *Thioalkalivibrio* [6].

Одним из центральных ферментов серного метаболизма у сероокисляющих бактерий является флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа (FCC) [12–16], которая катализирует окисление сульфид- и полисульфид-ионов до молекулярной серы с переносом электронов на цитохром *c*. Каталитически активная форма FCC представляет собой нековалентно связанный гетеродимер, состоящий из флавин-связывающей субъединицы (≈ 45 кДа) и моно- (≈ 10 кДа) [13, 14] или ди- (≈ 25 кДа) [12, 15, 16] гем *c*-связывающей субъединицы. Флавин-связывающая субъединица FCC содержит ковалентно связанную посредством простой тиоэфирной связи молекулу флавинадениндинуклеотида (FAD).

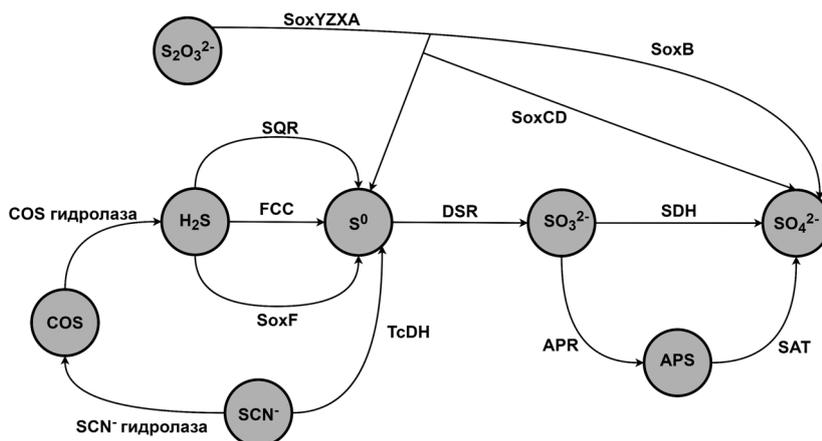


Рис. 1. Схема окислительного этапа серного цикла у бактерий рода *Thioalkalivibrio* [6]. SQR – сульфид: хиноноксидоредуктаза; FCC – флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа; SoxYZXA и SoxCD – компоненты сероокисляющей системы Sox; TcDH – тиоцианатдегидрогеназа; DSR – диссимиляционная сульфитредуктаза; SDH – сульфитдегидрогеназа; APR – аденозин-5'-фосфосульфатредуктаза; SAT – сульфатаденилилтрансфераза

В геноме одного из тиоцианат-окисляющих штаммов *Tv. paradoxus* ARh 1 [6] содержится 5 копий генных кластеров, кодирующих белки, гомологичные FCC. Ген одной из пяти потенциальных FCC (далее *TrpFCC*) расположен в непосредственной близости с опероном, отвечающим за биосинтез тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) – ключевого белка метаболизма тиоцианата у бактерий рода *Thioalkalivibrio* [6, 7, 11]. Сравнительный анализ транскриптомов бактерии *Tv. thiooxyanoxidans* ARh 2T, выращенной с тиосульфатом и тиоцианатом в качестве источника энергии, показал, что экспрессия гена TcDH и окружающих его генов сильно возросла при росте клеток на тиоцианате. Максимальное повышение уровня экспрессии достигалось для генов TcDH (\log_2 отношения уровней экспрессии гена при росте на тиоцианате и тиосульфате составлял 7,5) и FCC (соответствующий логарифм отношения уровней экспрессии составлял 6,94 – для флавиновой субъединицы FCC и 5,82 – для гем-содержащей субъединицы FCC). Другие гены в кластере TcDH показывают изменение уровня экспрессии в диапазоне 3,95–6,75 [6]. Следовательно экспрессия гена FCC у бактерии *Tv. thiooxyanoxidans* повышается специфически и строго ассоциирована с уровнем экспрессии гена TcDH. Можно предположить, что аналогичная ситуация реализуется и для близкородственной бактерии *Tv. paradoxus* ARh 1. Таким образом, *TrpFCC* является необходимым компонентом метаболизма тиоцианата у бактерий *Tv. paradoxus*. Однако роль *TrpFCC* в метаболизме тиоцианата неочевидна, поскольку разложение тиоцианата (рис. 1) не включает образования сульфид-ионов. Было высказано предположение, что *TrpFCC* может

участвовать в переносе электронов, образующихся при окислении тиоцианата TcDH [6].

Ранее *TrpFCC* была выделена нами из бактерии *Tv. paradoxus*, выращенной на тиоцианате, где она является одним из мажорных белков периплазматической фракции. Методом рентгеноструктурного анализа получена пространственная структура *TrpFCC* [17]. Сравнительный анализ пространственной структуры *TrpFCC* и структур FCC из других организмов подтвердил, что *TrpFCC* содержит все характерные особенности активных центров сульфиддегидрогеназ (FCC и SQR), включая редокс-активные остатки цистеина, вовлечённые в окисление сульфидов с последующим переносом электронов на FAD. Дополнительным подтверждением участия *TrpFCC* именно в окислении сульфид-ионов до серы является присутствие дополнительного атома серы как продукта реакции на одном из каталитических цистеинов [17]. Подобные структуры с цепочками из двух или восьми атомов серы в активном центре были получены ранее для FCC из *Thermochromatium tepidum* [16] и SQR из *Aquifex aeolicus* [18, 19]. Электрон-транспортная субъединица *TrpFCC* содержит один домен, связывающий один гем *c*, координированный остатками His и Met. Укладка полипептидной цепи цитохромного домена аналогична укладке полипептидной цепи в *N*-концевом домене двухдоменных цитохромных субъединиц у других FCC. В пространственной структуре, полученной в работе Osipov et al. [17], *TrpFCC* находится в комплексе с медь-связывающим белком CopC, для гена которого также наблюдалось повышение уровня транскрипции при росте на тиоцианате. Предполагается [17], что комплекс *TrpFCC*–CopC является частью более крупного

периплазматического комплекса, который включает также TcDH. Роль комплекса может заключаться в окислении тиоцианата и утилизации образующейся серы.

Для проверки этих предположений в настоящей работе проведена функциональная характеристика *Tr*FCC. Показано, что, подобно ранее описанному FCC, фермент обладает узкой субстратной специфичностью, катализируя окисление только сульфид-ионов. *Tr*FCC не катализирует окисление других анионов, содержащих атом серы в восстановленном состоянии (тиосульфат, тетратионат, сульфит), а также окисление или восстановление молекулярной серы. Для реакции окисления сульфид-иона *in vitro* подобраны оптимальные условия и определены кинетические параметры реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка *Tr*FCC. Биомасса *Tv. paradoxus* ARh 1 была выращена в колбах на минеральной $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ среде, содержащей 0,6 М общего Na^+ при pH 9,75, как описано ранее [5] с тиоцианатом натрия (10 мМ) в качестве источника энергии и азота. После поглощения всего тиоцианата в ростовую среду добавляли ещё одну порцию тиоцианата до концентрации 10 мМ. Концентрация ионов Cu^{2+} (в виде цитрата) в ростовой среде составляла 30 мкг/литр.

После полной утилизации тиоцианата клетки из 10 литров культуры были осаждены центрифугированием («Hitachi», Япония) и промыты буфером, содержащим 20 мМ MOPS, pH 7,5 и 0,6 М NaCl. *Tr*FCC выделяли из периплазматической фракции. Процедура выделения включала две стадии анионообменной хроматографии и стадию гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации). Для получения периплазматической фракции клетки инкубировали 10 мин в 42 мл лизирующего буфера (20 мМ MOPS, pH 7,5; 1 мг/мл лизоцим, 500 мМ сахараза) при комнатной температуре. Затем добавляли 63 мл воды Milli-Q и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) до концентрации 1 мМ и инкубировали 15 мин при 4 °С. Периплазматическую фракцию отделяли от сферопластов центрифугированием при 8000 об./мин, 30 мин («Allegra», США). Периплазматическую фракцию наносили на анионообменную колонку MonoQ 10/100 («GE Healthcare», США), уравновешенную 25 мМ MOPS, pH 7,5. Белки элюировали линейным градиентом 0–70% 1 М раствора NaCl в 25 мМ MOPS, pH 7,5. Хроматографию выполняли на приборе АСТА FPLC («GE Healthcare»,

США). Фракции, обладавшие сульфиддегидрогеназной активностью, были собраны при содержании 1М NaCl 30–40% и объединены. После диализа против 25 мМ MOPS, pH 7,5, объединённые фракции были повторно нанесены на колонку MonoQ 10/100, уравновешенную тем же буфером. FCC элюировали ступенчатым градиентом 1 М NaCl в 25 мМ MOPS, pH 7,5. Фракции, обладавшие сульфиддегидрогеназной активностью, элюировались при содержании NaCl – 42%. Завершающей стадией очистки являлась гель-проникающая хроматография на колонке Superdex 75 10/300 («GE Healthcare», США). Колонку уравновешивали 25 мМ MOPS, pH 7,5, 150 мМ NaCl.

Концентрацию белка определяли методом Бредфорда [20]. Чистоту белка анализировали методом Ds-Na-ПААГ электрофореза [21]. Идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF MS на масс-спектрометре Ultraflex III MALDI-TOF/TOF («Bruker», Германия).

Определение ферментативной активности *Tr*FCC. Ферментативная активность *Tr*FCC измерялась спектрофотометрически при 30 °С с использованием спектрофотометра Cary 100 Bio («Thermo Scientific», США). Реакционная смесь содержала 50 мМ глицин-NaOH буфер, pH 9,5, 10 мкМ сульфид натрия и 14 нМ фермент; 20 мкМ цитохром *c* из сердца лошади (*CytC*) («Sigma», США) использовали как акцептор электронов. Реакцию инициировали сульфидом натрия. Начальные скорости ферментативной реакции рассчитывали из начальных участков кинетических кривых восстановления *CytC*, регистрируемых при 550 нм ($\epsilon_{550} = 22\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). При расчётах вносили поправку на скорость неферментативной реакции, поэтому параллельно измеряли скорость восстановления *CytC* сульфидом натрия в отсутствие *Tr*FCC. Кинетические измерения проводили в трех независимых повторах. Концентрацию сульфида натрия в растворе определяли с помощью реактива Элмана (DTNB, 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота). DTNB взаимодействует со свободными сульфгидрильными группами, образуя смешанный дисульфид и ярко-желтую 2-нитро-5-тиобензойную кислоту ($\epsilon_{412} = 14\,150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Кинетические параметры сульфиддегидрогеназной реакции рассчитывали из зависимостей начальных скоростей реакции от концентрации субстратов.

В аналогичных условиях проверяли активность *Tr*FCC в реакции окисления других субстратов, заменяя сульфид на 1 мМ тиосульфат, сульфит или тетратионат, как это было опи-

сано в работе Visser et al. [13]. Для проверки активности *Tr*FCC в реакции окисления элементарной серы использовали серу из гранул *Tv. paradoxus*, полученную при выделении *Tr*FCC. Суспензию серы получали, как это было описано в статье Rühl et al. [22], с небольшими модификациями: 0,1 г серы суспендировали в 5 мл 50 мМ глицин-NaOH буфера, pH 9,5. Затем 2%-ную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Реакционную смесь, которая содержала 0,2%-ную суспензию серы, 20 мкМ *Sy*C и 52 нМ *Tr*FCC в 50 мМ глицин-NaOH буфере, pH 9,5, инкубировали на термощейкере («Eppendorf», США) при 30 °С. Из реакционной смеси периодически отбирали пробы, центрифугировали и снимали спектры для регистрации образования восстановленной формы *Sy*C. Аналогичный эксперимент проводили в отсутствие *Tr*FCC.

Для проверки способности *Tr*FCC катализировать обратную реакцию восстановления серы до сульфид-иона 0,2%-ную суспензию серы добавляли к предварительно восстановленной дитионитом *Tr*FCC и регистрировали изменение спектров *Tr*FCC. Окисление *Tr*FCC в присутствии серы указывало бы на наличие восстанавливающей активности [23]. Эту реакцию проводили в анаэробном боксе («Belle Technology», Великобритания) в атмосфере N₂ при остаточном содержании кислорода не выше 2 ppm. Все растворы предварительно продували аргоном высокой чистоты и выдерживали в анаэробном боксе в течение нескольких часов.

Определение продукта реакции. Для определения продукта реакции окисления сульфида ферментативную реакцию проводили до высоких степеней превращения. Добавление сульфида прекращали после выпадения визуально наблюдаемого осадка. Серные гранулы из бактерии *Tv. paradoxus* (стандарт) и полученный в реакции осадок растворяли в смеси хлороформ : метанол (1 : 9). Для идентификации продукта реакции был использован метод обращен-

но-фазовой хроматографии на колонке Nucleosil C18 («Sigma-Aldrich», США) в соответствии с предложенной ранее [24] и подробно описанной нами процедурой [11].

Биоинформатические методы. Для анализа использовали аминокислотную последовательность FCC, полученную по результатам MALDI TOF масс-спектрометрии (GenBank: AHE99077.1) генома бактерии *Tv. paradoxus* ARh 1. Поиск гомологов осуществлялся с использованием программы Protein BLAST на сервере NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выравнивание аминокислотных последовательностей FCC из различных организмов выполнено программой BLAST COBALT (http://www.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi), полученные данные визуализировали с помощью MultalignViewer (Chimera).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гомологи FCC в геноме *Tv. paradoxus*. Известно, что в геноме бактерии *Tv. paradoxus*, как и в геноме близкородственной ей бактерии *Tv. nitratireducens*, имеется 5 копий генов белков, гомологичных FCC [6]. Идентичность аминокислотных последовательностей разных копий FCC из *Tv. paradoxus* составляет 40–54% по флавиновой и 36–40% – по гем-содержащей субъединицам (табл. 1).

Только один белок (FCC_5 в табл. 1) содержит двухгемовую субъединицу, все остальные являются одnogемовыми (количество генов определяется по числу гем-связывающих мотивов CXXCH в аминокислотной последовательности белка).

При росте бактерии с различными донорами электронов наблюдается экспрессия различных генов FCC. Согласно нашим неопубликованным данным, если донором электронов является тиосульфат, то экспрессируются белки FCC_3 и FCC_5. При росте на тиоцианате в присут-

Таблица 1. Идентичность флавиновой и гемовой субъединиц у пяти копий FCC в геноме *Tv. paradoxus* ARh 1

FCC	Флавиновая субъединица		Гемовая субъединица	
	Protein_ID	Идентичность, %	Protein_ID	Идентичность, %
FCC_1	WP_006748978	100	WP_006748977	100
FCC_2	WP_006746610	40	WP_006746611	40
FCC_3	WP_006746125	54	WP_006746124	36
FCC_4	WP_006747456	51	WP_041483707	40
FCC_5	WP_006746847	49	WP_006746848	38

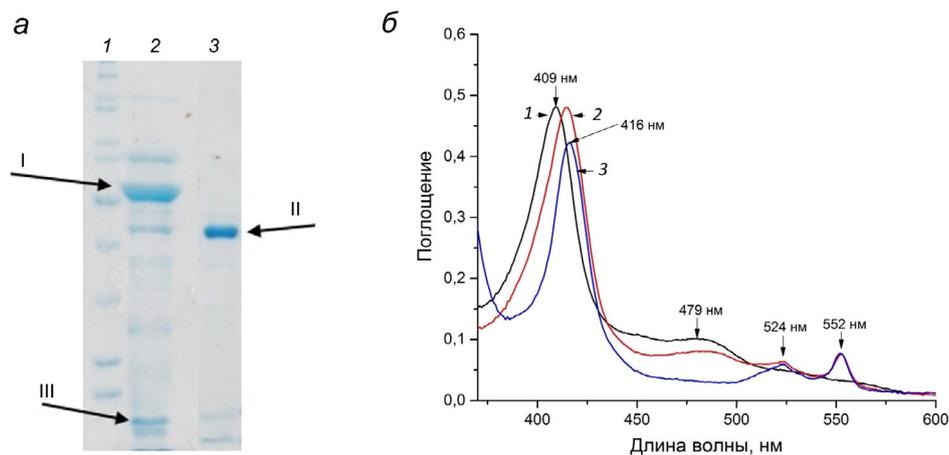


Рис. 2. Характеристика гомогенности и спектральных свойств препарата *TrpFCC*. *а* – Ds-Na-ПААГ электрофорез периплазматической фракции (дорожка 2) и конечного препарата *TrpFCC* (дорожка 3). На дорожках 2 и 3 обозначены FAD-содержащая субъединица *TrpFCC* с ММ 42 кДа (II), гем-содержащая субъединица двигалась с фронтом растворителя; TсDH (I) и медь-связывающий белок CopC (III). Дорожка 1 – маркеры ММ. *б* – Спектры окисленной (1) и восстановленной (2, 3) форм *TrpFCC*. Восстановление проводили с 1 мМ Na₂S (2) и 1 мМ Na₂S₂O₄ (3). Концентрация *TrpFCC* – 0,86 мкМ. На спектрах обозначены основные максимумы поглощения окисленной и восстановленной форм. (С цветным вариантом рис. 2 и 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ствии ионов Cu²⁺ бактерия *Tv. paradoxus* ARh 1 активно экспрессирует белок FCC_1 (далее *TrpFCC*) (табл. 1), который, наряду с TсDH и CopC, является мажорным белком периплазматической клеточной фракции в этих условиях (рис. 2, *а*). Полученные данные совпадают с результатами транскриптомного анализа, приведенными в работе Verben et al. [7], и указывают на потенциальное участие *TrpFCC* в процессе разложения тиоцианата. Для характеристики каталитических свойств *TrpFCC* был выделен из периплазматической фракции *Tv. paradoxus* ARh 1.

Физико-химические свойства *TrpFCC*. В полученном нами гомогенном препарате *TrpFCC* имеет молекулярную массу (ММ) ~50 кДа, согласно данным гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300, и состоит из двух субъединиц: FAD-связывающей с ММ ~42 кДа (рис. 2, *а*) и гем *с*-связывающей с ММ ~8 кДа.

Были измерены спектры окисленной и восстановленной формы *TrpFCC* с использованием в качестве восстановителя дитионита натрия, который способен полностью восстановить FAD и гем *с*, и сульфида натрия, который является основным субстратом FCC, т.е. должен в конечном итоге передавать электроны на гем *с* через FAD.

Полученные спектры очень похожи на ранее опубликованные спектры FCC из других организмов (табл. 2). В спектре окисленной формы *TrpFCC* (рис. 2, *б*) виден характерный пик поглощения окисленной формы FAD при длине волны 480 нм. Другая полоса поглощения FAD при 450 нм менее выражена, как и у других FCC [13,

26], и, возможно, частично маскируется более интенсивным пиком поглощения гемовой субъединицы с максимумом при 409 нм. При восстановлении *TrpFCC* сульфидом натрия (в концентрации 1 мМ) происходит частичное восстановление FAD и практически полное восстановление гема *с*. Дальнейшее добавление сульфида натрия не приводит к дополнительному восстановлению *TrpFCC*. По-видимому, в этих условиях FAD, получив 2 электрона от сульфида, передает 1 электрон на гем *с* и остается в семихиноновой форме, в которой частично сохраняется пик поглощения при 480 нм. Введение в реакционную смесь дитионита натрия с редокс-потенциалом –560 мВ не изменяет степень восстановления гема *с*, но приводит к полному восстановлению FAD. Восстановленная форма *TrpFCC* характеризуется полосами поглощения восстановленной формы гема *с* при 416, 524 и 552 нм.

Характеристика каталитической активности *TrpFCC*. Структурные данные указывают, что *TrpFCC* является типичной флавоцитохром *с* сульфиддегидрогеназой. Поэтому в качестве основного субстрата для характеристики *TrpFCC* рассматривался сульфид-ион. В качестве акцептора электронов *in vitro* использовался цитохром *с* из сердца лошади, *CytC* (как в большинстве публикаций, посвященных характеристике каталитических свойств FCC [12, 13, 25–27]).

Оптимизация условий определения активности. *TrpFCC* расположена в периплазме галоалкалофильной бактерии *Tv. paradoxus*, имеющей значение pH ~9,0 и содержание соли ~1 М [9]. Для оптимизации условий определения актив-

Таблица 2. Спектральные и молекулярные свойства FCC из разных микроорганизмов

Свойства FCC	<i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> ARh 1	<i>Chromatium vinosum</i> [12]	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i> [25]	<i>Thiobacillus</i> sp. W5 [13]	<i>Thermochromatium tepidum</i> [26]
Пики поглощения FAD _{ox} , нм	450, 479	450, 480		450, 480	
Пики поглощения гема <i>c</i> _{ox} , нм	409	410	410	410	410
Пики поглощения гема <i>c</i> _{red} , нм	416, 524, 552	416, 523, 552	417, 523, 553	416, 523, 552	416, 523, 552
Нативный белок ММ, кДа	50	77	58	51	68
FAD-связывающая субъединица, ММ, кДа	42	46	47	40	43
Гем-связывающая субъединица, ММ, кДа	7,3 (1 гем)	21 (2 гема)	11 (1 гем)	11 (1 гем)	25 (2 гема)

ности и сравнения их с физиологическими условиями функционирования фермента проверяли влияние pH, природы буфера и ионной силы.

Для оценки влияния ионной силы в реакционную смесь добавляли NaCl. В 0,1 М NaCl активность фермента составляет ~50% от исходной (рис. 3, а). Можно предположить, что увеличение ионной силы ослабляет ионные взаимодействия сульфид-иона с белком или затрудняет электростатическое взаимодействие *SuS* с цитохром *c*-субъединицей FCC. Таким образом, оптимальными для кинетических экспериментов являются условия с низкой ионной силой.

Определение pH-оптимума проводили в диапазоне pH 7–10,5 с использованием двух буферных растворов: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,0–8,6, и 50 мМ глицин-NaOH, pH 8,6–10,5 (рис. 3, б). Эксперимент показал, что фермент имеет мак-

симальную активность в интервале pH от 8,5 до 9,0. Эти данные согласуются с тем, что *Trp*FCC является периплазматическим белком галоалкалофильной бактерии, для которой оптимальным условием для роста является pH 9–10 [9].

Наибольшую активность фермент проявлял в глициновом буфере, поэтому для проведения кинетических экспериментов были выбраны следующие условия: 25 мМ глицин-NaOH, pH 8,6.

В этих условиях была проверена активность *Trp*FCC с другими субстратами. *Trp*FCC не катализирует реакции окисления тиосульфата, сульфита, тетрагидрата и элементарной серы. Ранее подобный результат был получен для FCC из других источников [13]. Поскольку на первой стадии дыхательного цикла у *Tv. paradoxus* при росте на тиоцианате происходит окислительное разложение тиоцианата с образованием элемент-

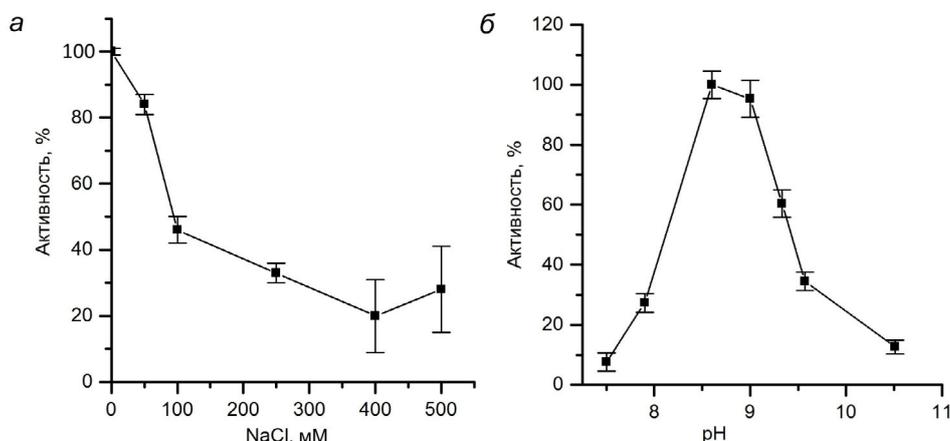


Рис. 3. Факторы, влияющие на каталитическую активность *Trp*FCC. а – Влияние ионной силы (концентрации NaCl) на активность *Trp*FCC. б – pH-Зависимость активности *Trp*FCC

ной серы, было выдвинуто предположение, что FCC может катализировать обратную реакцию восстановления элементарной серы до сульфида с последующим окислением его, например, обратной диссимильаторной сульфитредуктазой (DSR на рис. 1), катализирующей взаимопревращение сульфит-иона в сульфид (или серу) и наоборот. Однако проведённый нами эксперимент показал, что элементарная сера не окисляет восстановленную форму *TrpFCC*, т.е. *TrpFCC* не переносит электроны на серу. Следует отметить, что поверхность FAD-содержащей субъединицы в области входа в сайт связывания сульфид-иона имеет положительный заряд [17], что не способствует связыванию такого гидрофобного незаряженного субстрата, как сера. Таким образом, *TrpFCC* не катализирует обратную реакцию восстановления серы до сульфида и, следовательно, не может участвовать в утилизации серы, образующейся при окислении тиоцианата. Поскольку в рамках проведённого исследования обнаружен только один субстрат для *TrpFCC* – сульфид-ион, что совпадает с данными, полученными для других FCC [12, 13], были охарактеризованы кинетические параметры этой реакции.

Определение кинетических параметров. Кинетика окисления сульфида натрия и восстановления *CytC* в отсутствие продуктов реакции опи-

сывается следующим уравнением для двухсубстратной реакции с образованием тройного комплекса [28]:

$$v = \frac{\left(\frac{V \cdot [CytC]}{K_{M, CytC} + [CytC]}\right) \cdot [S]}{\left(\frac{K_{i,S} \cdot K_{M, CytC} + K_{M,S} \cdot [CytC]}{K_{M, CytC} + [CytC]}\right) + [S]} = \frac{V_S^{каж} \cdot [S]}{K_{M}^{каж} + [S]}, \quad (1)$$

Наблюдаемые константы Михаэлиса ($K_M^{каж}$) равны $1,9 \pm 0,4$ мкМ для сульфида и 8 ± 3 мкМ – для *CytC* при фиксированной концентрации второго субстрата. Эти данные хорошо соотносятся с константами Михаэлиса, измеренными для FCC из *Thiobacillus* (K_M для сульфида – $1,7 \pm 0,4$ мкМ, K_M для цитохрома – $3,8 \pm 0,8$ мкМ) [13]. Максимальная удельная активность при данных концентрациях равнялась 54 ± 9 мкмоль (*CytC*)/мин на мг белка. Однако полученные константы являются кажущимися, поскольку являются функциями от концентрации второго субстрата. Эксперимент по определению истинных кинетических констант включал в себя измерение кинетических констант по сульфид-иону ($V_S^{каж}$, $K_M^{каж}$) при различных фиксированных концентрациях *CytC* (5, 8, 10, 20 мкМ):

$$V_S^{каж} = \frac{V \cdot [CytC]}{K_{M, CytC} + [CytC]}, \quad (2)$$

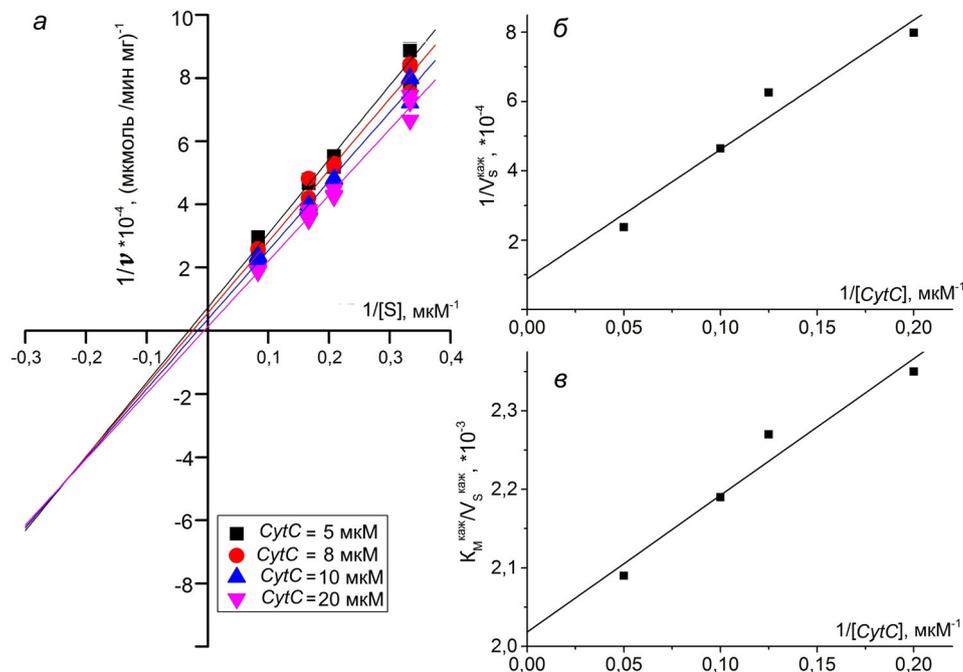


Рис. 4. Определение кинетических констант реакции окисления сульфид-ионов *TrpFCC*. *a* – График зависимости начальной скорости реакции от концентрации сульфида в двойных обратных координатах при различных фиксированных концентрациях *CytC*. *б* – График зависимости максимальной скорости реакции от концентрации *CytC* в двойных обратных координатах. *в* – График зависимости $K_M^{каж}/V_S^{каж}$ от обратной концентрации *CytC*

$$K_M^{\text{каж}} = \frac{K_{i,s} \cdot K_{M,CyTC} + K_{M,s} \cdot [CyTC]}{K_{M,CyTC} + [CyTC]}, \quad (3)$$

где $K_{i,s}$ – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса ES.

Результаты представлены в виде первичных графиков в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 4, а). Прямые, соответствующие фиксированным концентрациям $CyTC$, пересекались в точке с координатами $((1 - K_{M,s}/K_{i,s})/V; -1/K_{i,s})$. Пересечение с осью абсцисс соответствует $-1/K_M^{\text{каж}}$, с осью ординат $-1/V^{\text{каж}}$. Данный вид графика характерен для ферментативных реакций с образованием тройного комплекса.

Из вторичного графика в координатах $(1/V_S^{\text{каж}}; 1/[CyTC])$ определяли значение $1/V$ по пересечению с осью ординат и $K_{M,CyTC}/V$ – по тангенсу угла наклона (рис. 4, б):

$$\frac{1}{V_S^{\text{каж}}} = \frac{1}{V} + \frac{K_{M,CyTC}}{V} \cdot \frac{1}{[CyTC]}. \quad (4)$$

Для определения истинной константы Михаэлиса по сульфиду построен график в координатах $(K_M^{\text{каж}}/V_S^{\text{каж}}; 1/[CyTC])$. Точка пересечения прямой с осью ординат дает значение $K_{M,s}/V$, по которому, зная максимальную скорость, можно определить искомую константу (рис. 4, в).

В результате обработки данных были получены следующие значения кинетических параметров:

$V = 80 \pm 40$ мкмоль $CyTC$ /мин на мг белка,
 $k_{\text{cat}} = 0,67 \text{ с}^{-1}$;

$K_{M,CyTC} = 26 \pm 1$ мкМ;

$K_{M,s} = 157 \pm$ мкМ.

Из-за особенностей субстратов мы не могли работать в области их насыщения, поскольку

для $CyTC$ при больших концентрациях наблюдается слишком высокая оптическая плотность, а для сульфид-иона при высоких концентрациях становится существенным вклад неферментативного восстановления цитохрома *c*. В других посвящённых FCC работах измерение кинетических параметров также проводили в ненасыщающих концентрациях одного из субстратов, что не позволяет напрямую сравнивать полученные значения. По этой же причине различаются наблюдаемые и истинные значения K_M и V .

В заключение можно сказать, что *TrFCC* является типичной сульфиддегидрогеназой, катализирующей окисление сульфида с образованием элементарной серы и переносом электронов на цитохром *c*. Роль этого фермента в метаболизме тиоцианата осталась невыясненной. Однако проведённые нами предварительные эксперименты (результаты не приведены) показали, что присутствие каталитических количеств FCC в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH, приводит к изменению формы кинетических кривых и увеличению скорости реакции. Механизм наблюдаемого явления пока не установлен и является предметом последующего исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00314, характеристика фермента, ферментативная кинетика) и Министерства науки и высшего образования РФ (выделение фермента).

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

- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D., and Muyzer, G. (2014) Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes, *Extremophiles*, **18**, 791–809, doi: 10.1007/s00792-014-0670-9.
- Sorokin, D. Y., Banciu, H., Robertson, L. A., Kuenen, J. G., Muntyan, M. S., and Muyzer, G. (2013) in *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* (Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., eds) Springer, Berlin, pp. 529–554, doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_77.
- Sorokin, D. Y., Kuenen, J. G., and Muyzer, G. (2011) The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes, *Front. Microbiol.*, **2**, 44, doi: 10.3389/fmicb.2011.00044.
- Sorokin, D. Y., and Kuenen, J. G. (2005) Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 685–702, doi: 10.1016/j.femsre.2004.10.005.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., and Kuenen, J. G. (2001) Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 528–538, doi: 10.1128/AEM.67.2.528-538.2001.
- Berben, T., Overmars, L., Sorokin, D. Y., and Muyzer, G. (2017) Comparative genome analysis of three thiocyanate oxidizing *Thioalkalivibrio* species isolated from soda lakes, *Front. Microbiol.*, **8**, 254, doi: 10.3389/fmicb.2017.00254.
- Berben, T., Balkema, C., Sorokin, D. Y., and Muyzer, G. (2017) Analysis of the genes involved in thiocyanate oxidation during growth in continuous culture of the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh 2T using transcriptomics, *mSystems*, **2**, e00102-17, doi: 10.1128/mSystems.00102-17.
- Berben, T., Overmars, L., Sorokin, D. Y., and Muyzer, G. (2019) Diversity and distribution of sulfur oxidation-related genes in *Thioalkalivibrio*, a genus of chemolithoau-

- trophic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria, *Front. Microbiol.*, **10**, 160, doi: 10.3389/fmicb.2019.00160.
9. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., and Kuenen, J. G. (2002) *Thioalkalivibrio thiooxydans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 657–664, doi: 10.1099/00207713-52-2-657.
 10. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Sjollem, K. A., and Kuenen, J. G. (2003) *Thioalkalivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1779–1783, doi: 10.1099/ijs.0.02615-0.
 11. Tikhonova, T. V., Sorokin, D. Y., Hagen, W. R., Khrenova, M. G., Muzer, G., et al. (2020) Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 5280–5290, doi: 10.1073/pnas.1922133117.
 12. Fukumori, Y., and Yamanaka, T. (1979) Flavocytochrome *c* of *Chromatium vinosum*. Some enzymatic properties and subunit structure, *J. Biochem.*, **85**, 1405–1414, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132467.
 13. Visser, J. M., de Jong, G., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G. (1997) A novel membrane-bound flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5, *Arch. Microbiol.*, **167**, 295–301, doi: 10.1007/s002030050447.
 14. Kostanjevecki, V., Brigé, A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Guisez, Y., and van Beeumen, J. (2000) A membrane-bound flavocytochrome *c*-sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic sulfur bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*, *J. Bacteriol.*, **182**, 3097–3103, doi: 10.1128/jb.182.11.3097-3103.2000.
 15. Chen, Z., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., Bartsch, R., et al. (1994) The structure of flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium, *Science*, **266**, 430–432, doi: 10.1126/science.7939681.
 16. Hirano, Y., Kimura, Y., Suzuki, H., Miki, K., and Wang, Z.-Y. (2012) Structure analysis and comparative characterization of the cytochrome *c'* and flavocytochrome *c* from thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*, *Biochemistry*, **51**, 6556–6567, doi: 10.1021/bi3005522.
 17. Osipov, E. M., Lilina, A. V., Tsallagov, S. I., Safonova, T. N., Sorokin, D. Y., et al. (2018) Structure of the flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1, *Acta Cryst.*, **D74**, doi: 10.1107/S2059798318005648.
 18. Marcia, M., Ermiler, U., Peng, G., and Michel, H. (2009) The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9625–9630.
 19. Brito, J. A., Sousa, F. L., Stelter, M., Bandejas, T. M., Vonrhein, C., et al. (2009) Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase, *Biochemistry*, **48**, 5613–5622.
 20. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 21. He, F. (2011) Laemmli-SDS-PAGE, *Bio-101*, e80, doi: 10.21769/BioProtoc.80.
 22. Rühl, P., Pöll, U., Braun, J., Klingl, A., and Kletzin, A. (2017) A sulfur oxygenase from the haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with atypically low reductase activity, *J. Bacteriol.*, **199**, e00675–16, doi: 10.1128/JB.00675-16.
 23. Ma, K., and Adams, M. W. (1994) Sulfide dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new multifunctional enzyme involved in the reduction of elemental sulfur, *J. Bacteriol.*, **176**, 6509–6517, doi: 10.1128/jb.176.21.6509-6517.1994.
 24. Alberta Environment and Parks (2015) *Development and Validation of Analytical Methods for Elemental Sulfur in Alberta Soils*, Prepared by Maxxam Analytics International Corporation for Alberta Environment and Parks, Edmonton, Alberta.
 25. Yamanaka, T. (1976) The Subunits of *Chlorobium* Flavocytochrome *c*, *J. Biochem.*, **79**, 655–660, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131110.
 26. Castillo, M., Bih-Show, L., and Ondrias, M. R. (1994) Characterization of flavocytochrome *c* 552 from the thermophilic photosynthetic bacterium *Chromatium tepidum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 262–266.
 27. Sorokin, D. Yu., de Jong, G. A. H., Robertson, L. A., and Kuenen, G. J. (1998) Purification and characterization of sulfide dehydrogenase from alkaliphilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria, *FEBS Lett.*, **427**, 11–14.
 28. Cornish-Bowden, A. (2012) *Fundamentals of enzyme kinetics*, Wiley-Blackwell, Fourth Edition, p. 422.

CATALYTIC PROPERTIES OF FLAVOCYTOCHROME *c* SULFIDE DEHYDROGENASE FROM HALOALKALIPHILIC BACTERIUM *Thioalkalivibrio paradoxus**

T. V. Tikhonova**, A. V. Lilina, E. M. Osipov, N. S. Shipkov,
N. I. Dergousova, O. G. Kulikova, and V. O. Popov

Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: ttikhonova@inbi.ras.ru

Flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase (FCC) is one of the central enzymes of oxidative sulfur metabolism in sulfur-oxidizing bacteria. FCC catalyzes oxidation of sulfide and polysulfide ions to elemental sulfur with cytochrome *c* as an electron acceptor. The catalytically active form of the enzyme is a noncovalently bound heterodimer composed of the flavin-binding and the heme-binding subunits. The *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1 genome contains five copies of the gene for FCC. The amino acid sequence identity between the different copies of FCC genes differs from 54 to 36%. When a bacterium grows on thiocyanate or thiosulfate as the main energy sources, the products of different copies of the FCC genes are synthesized. In this paper, we isolated and characterized FCC, which is synthesized during the growth of *Tv. paradoxus* on thiocyanate. FCC has been shown to oxidize sulfide and not to oxidize other reduced sulfur compounds, such as thiosulfate, sulfite, tetrathionate, and molecular sulfur, and does not catalyze the reverse reaction of sulfur reducing to sulfide. The kinetic parameters of the sulfide ion oxidation reaction are characterized.

Keywords: sulfur-oxidizing bacteria, flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase, thiocyanate dehydrogenase, enzyme kinetics

УДК 612.744.24-612.018;577.218

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ И СТАТИЧЕСКИХ НАГРУЗОК НА КОНЦЕНТРАЦИЮ МИОКИНОВ В ПЛАЗМЕ И НА СОДЕРЖАНИЕ НАТРИЯ И КАЛИЯ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ

© 2021 Т.А. Кироненко¹, К.Г. Милованова¹, А.Н. Захарова¹, С.В. Сидоренко²,
Е.А. Климанова^{1,2}, Е.Ю. Дьякова¹, А.А. Орлова¹, Е.С. Негоденко¹,
Ю.Г. Калининкова¹, С.Н. Орлов^{1,2}, Л.В. Капилевич^{1*}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050 Томск, Россия; электронная почта: kapil@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.07.2020

После доработки 15.09.2020

Принята к публикации 29.10.2020

Модификация продукции цитокинов под влиянием физических нагрузок представляет значительный интерес, так как является перспективным путем коррекции процессов метаболизма как на клеточном, так и на системном уровнях. В работе изучено содержание IL-6, IL-8 и IL-15 в плазме и одновалентных катионов в скелетных мышцах у мышей спустя разное время после статических и динамических нагрузок с учетом предварительной тренировки. Динамические упражнения вызывают увеличение содержания IL-6 и снижение IL-15 в плазме нетренированных мышей, не влияя на концентрацию IL-8. У тренированных мышей эффекты однократной нагрузки на концентрацию IL-6 и IL-15 в плазме усиливались, также отмечалось снижение концентрации IL-8. В отличие от динамических, статические нагрузки оказывают аналогичное, но более выраженное влияние на концентрацию IL-6 и IL-15 в плазме. Однако концентрация IL-8 в ответ на статическую нагрузку существенно увеличивалась. Предварительные тренировки усиливали описанные реакции для всех изученных миокинов. Показано разнонаправленное влияние динамической нагрузки (плавание) на содержания внутриклеточного натрия (повышение) и калия (снижение) в *musculus soleus* мыши. Впервые обнаружено, что аналогичное явление наблюдается при статической нагрузке (вис на сетке) в *musculus biceps* мыши и достоверно не зависит от предварительной тренировки экспериментальных животных. Обсуждаются возможные механизмы, обеспечивающие регуляцию секреции цитокинов после физической нагрузки, в том числе $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимый механизм запуска транскрипции генов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: физические нагрузки, миокины, ионы, Na^+/K^+ -АТРаза, транскрипция, трансляция.

DOI: 10.31857/S0320972521030118

ВВЕДЕНИЕ

Клетки скелетных мышц составляют важную часть опорно-двигательного аппарата, обеспечивая движение или сохранение позы организма. Эта их функция тесно сопряжена с процессами потребления и производства энергии [1]. Однако в последнее десятилетие внимание исследователей привлекла способность скелетных мышц продуцировать биологически активные вещества. Выяснилось [2–5], что на фоне физической активности происходит повышение содержания в плазме крови ряда цитокинов, в том числе IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, фактора некроза

опухоли- α (TNF- α) и лейкемия-ингибирующего фактора (LIF). К настоящему времени сформировалась концепция об эндокринной функции скелетных мышц, а за веществами, продуцируемыми мышечными клетками при сокращении, закрепилось название «миокины». Установлено, что скелетные мышцы являются основным (хотя и не единственным) источником продукции IL-6, с чем связано возрастание его содержания в плазме крови после физической нагрузки [6]. Показано увеличение транскрипции матричной RNA (mRNA) IL-6 в ядрах мышечных клеток, выделенных из биоптатов мышц людей после выполнения однократного упражнения [7]. Кроме того, для изучения продукции миокинов мышечными клетками использовали культуры миобластов мышей линии C2C12 и первичные человеческие миотубулы, которые подвергали электростимуля-

Принятые сокращения: EPS – электростимуляция; HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; IL – интерлейкин; mRNA – матричная RNA.

* Адресат для корреспонденции.

ции (EPS) [8–10]. При использовании такого подхода было показано, что через 24 ч после EPS в миотубулах человека происходит достоверное изменение транскрипции 183 генов, а также увеличение секреции IL-6, IL-8, хемокина CXCL1 и лейкомиа-ингибирующего фактора [11]. Таким образом, скелетные мышцы как эндокринный орган способны продуцировать цитокины и другие пептиды [12]. По мнению многих исследователей, эти соединения могут быть классифицированы как миокины, которые оказывают различные физиологические эффекты на организм [13–15]. В то же время в литературе практически не описана зависимость продукции миокинов от характера (статическая и динамическая) и от интенсивности физических нагрузок.

В связи с многочисленными подтверждениями того факта, что именно сократительная активность мышечных клеток является пусковым механизмом продукции миокинов, внимание исследователей привлекла проблема механохимического сопряжения, то есть механизма, опосредующего образование и/или высвобождение этих молекул при возбуждении/сокращении миоцитов [16–18]. Существуют различные точки зрения, объясняющие возможные механизмы, однако наше внимание привлекает гипотеза, предполагающая ключевую роль изменения внутриклеточных концентраций одновалентных катионов в запуске продукции миокинов [17, 18].

В многочисленных исследованиях было показано, что как у человека, так и у экспериментальных животных интенсивные физические упражнения способствуют увеличению $[Na^+]_i$ в 3–4 раза и уменьшению $[K^+]_i$ до 50% в скелетных мышцах за счет активации ионных каналов, а также путем частичного ингибирования Na^+/K^+ -АТФазы. Было также продемонстрировано, что выход K^+ из мышечных клеток во время упражнений приводит к повышению $[K^+]_i$ в интерстициальной жидкости скелетных мышц от 4–5 до 11–15 мМ. У людей интенсивные динамические и статические упражнения приводят к 2× повышению уровня $[K^+]_i$ в венозной крови из-за его выхода из скелетных мышц, которые являются основным источником внутриклеточного K^+ в организме [19–25].

В исследованиях Danilov et al. [26] было показано, что EPS клеток скелетной мускулатуры мышцей линии C2C12, широко используемой в качестве модели мышечных сокращений *in vitro*, приводила к диссипации трансмембранного градиента одновалентных катионов. Через 2 и 4 ч EPS внутриклеточное содержание Na^+ увеличилось со 130 до 330 и 500 нмоль/мг белка, тогда как внутриклеточное содержание K^+ снизилось с 1150 до 922 и 790 нмоль/мг белка соответствен-

но. Эти результаты согласуются с уменьшением $[K^+]_i$ и увеличением $[Na^+]_i$, наблюдавшимися при тренировке скелетных мышц *in vivo* [27].

Увеличение внутриклеточного соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является достаточным условием изменения транскрипции десятков универсальных и сотен тканеспецифических генов [28]. В ряде случаев эти изменения транскрипции не связаны с возможным приростом $[Ca^{2+}]_i$. Было показано, что в условиях гипоксии наблюдается увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, что может быть достаточным условием для изменения транскриптома этих клеток [28]. Было обнаружено, что диссипация трансмембранного градиента одновалентных катионов, вызванная ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы, приводит к увеличению транскрипции генов *PTGS2* и *NR4A1* с помощью Ca^{2+} /кальмодулин-опосредованного фосфорилирования транскрипционного фактора, способного связывать CRE-последовательности ДНК (CREB), и опосредованного кальцинейрином дефосфорилирования ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) соответственно [28]. В наших предыдущих работах [29–31] доказано влияние диссипации градиентов одновалентных катионов на экспрессию генов и продукцию миокинов.

Таким образом, можно считать установленным, что сократительная активность мышечных клеток сопровождается диссипацией градиентов одновалентных катионов. В свою очередь, изменение внутриклеточного содержания Na^+ и K^+ служит пусковым фактором изменения транскрипции генов [32–35].

Однако в литературе не описаны закономерности диссипации ионных градиентов в зависимости от характера и интенсивности физической нагрузки, а также от предварительной тренировки. В связи с этим целью исследования было выяснение характера влияния динамических и статических нагрузок на концентрацию миокинов в плазме крови и на содержание Na^+ и K^+ в скелетных мышцах мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальных животных использовались половозрелые (8–12 недель) мышца-самцы линии C57Bl/6 массой 25–30 г (виварий НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга СО РАН, Томск, Россия). Для проведения исследования были сформированы группы для острого (нетренированные мыши) и хронического (тренированные мыши) экспериментов. Схема экспериментов и количество животных в каждой группе представлены на рис. 1.

Схема эксперимента и количество животных в группах. В остром эксперименте мышей контрольной группы (n = 5) не подвергали физической нагрузке, мышей экспериментальной группы разделяли на две подгруппы, каждую из которых подвергали воздействию однократной физической нагрузки одного из двух видов: динамическая нагрузка в виде принудительного плавания [36, 37] с отягощениями 5, 7,5 и 10% от массы тела (n = 60) и статическая нагрузка в виде вися на сетке [37] с аналогичными отягощениями (n = 60). Время нагрузки с 5%-ным грузом от массы тела составляло 60 мин, с 7,5%-ным грузом – 20 мин и с 10%-ным – 10 мин. В хроническом эксперименте всех мышей подвергали регулярной физической нагрузке (тренировке) в виде плавания [38] (n = 65) или вися на сетке (n = 65) (соответственно группе) в течение 4-х недель по 1 ч в день без отягощения. После этого мышей делили на две группы – контрольную (n = 10) и экспериментальную (n = 120). Исследование выполняли по той же схеме, что и в первом (остром) эксперименте.

Режимы хронических нагрузок подбирались на основании литературных данных, в частности работы Каркищенко с соавт. [39], в которой показано, что наиболее оптимальной модификацией теста Портсолта для оценки физической выносливости крыс является плавание животного с грузом 10% от массы тела. Использование груза более 15% приводит к быстрому утомле-

нию, а плавание с грузом менее 5% способствует обучению животных.

Умерщвление животных (методом декапитации) производили непосредственно после нагрузки, а также через 1, 5 и 24 ч. Кровь собирали непосредственно после декапитации в пробирки с гепарином (20 ед./мл). Центрифугирование образцов проводили в течение 11 мин при 2000 об./мин на Microfuge 16 Centrifuge («Beckman Coulter», Германия).

Определение концентрации белков в плазме производили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Были использованы наборы для ИФА с антителами к соответствующим белкам: IL-6 Platinum ELISA Kit, IL-8 Platinum ELISA Kit («eBioscience», Австрия), а также RayBio® IL-15 ELISA Kit («RayBio®», США). Выбор белков для исследования был обусловлен литературными данными о продукции миокинов при физических нагрузках [2–8, 12], при стимуляции клеточной культуры миоцитов [10, 11], а также результатами наших исследований на спортсменах [17].

Определения концентрации ионов Na⁺ и K⁺. Материалом для определения концентрации ионов служили мышцы, извлекаемые сразу же после декапитации; в зависимости от характера нагрузки извлекали 2 вида мышц: камбаловидную мышцу (*musculus soleus*) – у мышей, подвергавшихся нагрузке в виде плавания, и двуглавую мышцу (*musculus biceps*) – у мышей, подвергав-

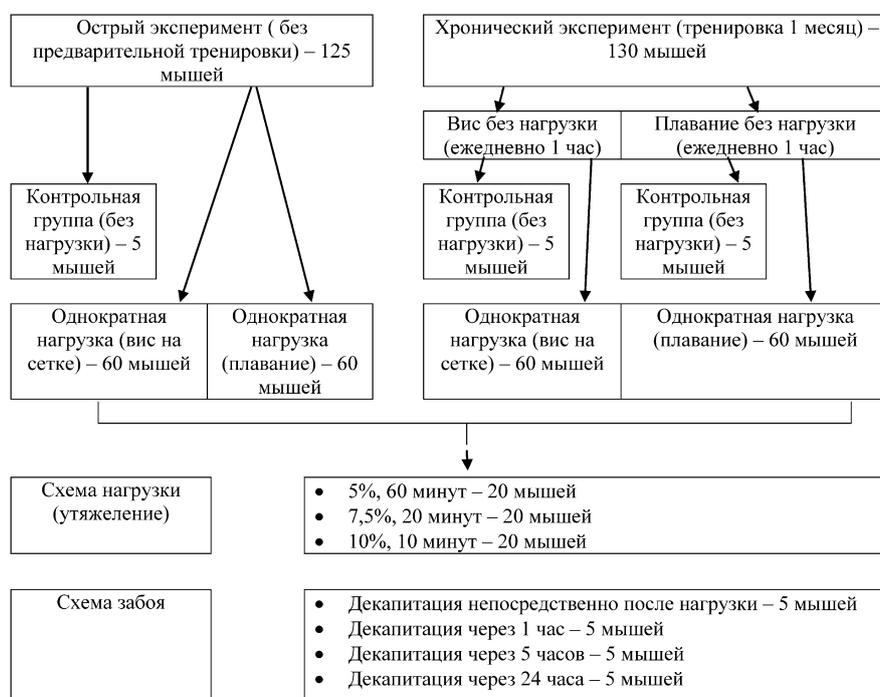


Рис. 1. Схема эксперимента и количество животных в группах

шихся нагрузке в виде вися на сетке. Образцы мышц для определения ионов забирали только непосредственно после нагрузки. Препарирование мышц проводили в PBS-буфере на льду, образцы помещали в промывочный раствор (100 мМ $MgCl_2$, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4) на льду и инкубировали в течение 15 мин, затем раствор меняли на свежий; данную процедуру повторяли 4 раза. Извлеченную мышцу взвешивали и разрезали на мелкие части, после чего помещали в микропробирку, содержащую 5%-ный раствор ТХУ, для полного извлечения ионов из ткани.

Через сутки содержимое микропробирки гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тefлоновым пестиком, после чего дополнительно проводили ультразвуковую дезинтеграцию образцов с использованием «Bradson 450 Digital Sonifier» («Marshall Scientific», США) в течение 30 с при мощности 15% от максимальной амплитуды, процедуру повторяли 3 раза до полной гомогенности суспензии. Полученный образец центрифугировали при 18 000 g на лабораторной центрифуге «ELMI CM-50» («ELMI», Латвия) в течение 10 мин, супернатант переносили в пробирку 1,5 мл для последующего измерения концентрации ионов. К осадкам добавляли лизирующий буфер, RIPA, содержащий коктейль ингибиторов протеаз («Sigma-Aldrich», USA). При определении концентрации белка использовали модифицированный метод Лоури.

Содержание Na^+ и K^+ в экстрактах ТХУ определяли методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии с использованием спектрометра «Квант-2м1» («Кортек», Россия) со смесью пропан-воздух. Для калибровки использовали растворы KCl (0,5–4 мг/литр K^+) и NaCl (0,05–2 мг/литр Na^+), содержащие 5% ТХУ. Содержание Na^+ и K^+ каждой пробы нормализовали по мокрому весу соответствующей мышцы. Все растворы готовили с использованием дважды деионизованной воды.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 8.0. Уровень значимости при проверке гипотезы принадлежности двух выборок к одной генеральной совокупности оценивали по Kruskal–Wallis ANOVA test. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика содержания интерлейкинов в плазме у тренированных и нетренированных мышей. На рис. 2 представлена динамика содержания интерлейкинов в плазме у тренированных и нетре-

нированных мышей в различные сроки после принудительного плавания. Продукция IL-6 у нетренированных животных усиливается через 5 ч после плавания (до $207,3 \pm 23,7$ пг/мл по сравнению с $57,64 \pm 9,36$ пг/мл в контроле, $p < 0,01$) и пропорциональна степени утяжеления. Через 24 ч после плавания концентрация IL-6 в плазме возвращалась к исходным значениям. У тренированных животных исходный уровень данного цитокина в плазме ниже ($33,8 \pm 8,1$ пг/мл против $57,6 \pm 9,3$ пг/мл у нетренированных), однако прирост после плавания происходит практически сразу и достигает $111,5 \pm 7,9$ пг/мл ($p < 0,05$), хотя второй пик его концентрации через 5 ч после плавания ($106,3 \pm 8,5$ пг/мл, $p < 0,05$) сохраняется и в этом случае. Известно, что IL-6 индуцирует расщепление и окисление жиров, он также принимает участие в поддержании гомеостаза глюкозы во время упражнений, поэтому его можно рассматривать как фактор, усиливающий энергообеспечение. Оказывая противовоспалительный эффект, IL-6 может ингибировать инсулинорезистентность, индуцированную фактором некроза опухоли- α (TNF- α) [40].

Концентрация IL-15 в плазме после принудительного плавания у нетренированных животных изменялась не столь значительно, снижение фиксировалось только через 24 ч (до $10,8 \pm 4,0$ пг/мл, $p < 0,01$) (рис. 2). Данное явление можно связать с эффектом компенсации, который наиболее выражен при первой нагрузке.

В группе мышей, подвергавшихся ежедневному плаванию в течение 4-х недель, на фоне исходно сниженной до $17,1 \pm 4,6$ пг/мл ($p < 0,01$) концентрации IL-15 в плазме ее увеличение непосредственно после плавания (до $51,9 \pm 11,7$ пг/мл, $p < 0,01$) сменялось выраженным падением до значений $11,9 \pm 3,8$ пг/мл ($p < 0,01$) через 1 ч и характеризовалось длительным процессом восстановления. IL-15 рассматривается как анаболический фактор, так как способен стимулировать рост мышц. Кроме того, IL-15 участвует в метаболизме липидов [36].

Концентрация IL-8 в плазме у нетренированных мышей не изменялась на фоне динамических нагрузок независимо от утяжеления (рис. 2). После 4-х недель ежедневных плавательных нагрузок фоновая концентрация данного интерлейкина возрастала до $63,75 \pm 7,43$ пг/мл ($p < 0,05$). После однократной физической нагрузки у всех тренированных мышей мы наблюдали снижение концентрации IL-8 в плазме. Непосредственно после нагрузки это снижение было более выражено в группе с максимальным отягощением ($63,75 \pm 7,43$ пг/мл в контроле (1), $36,42 \pm 3,65$ пг/мл с отягощением 5% (2), $55,30 \pm 7,91$ пг/мл с отягощением 7,5% (3),

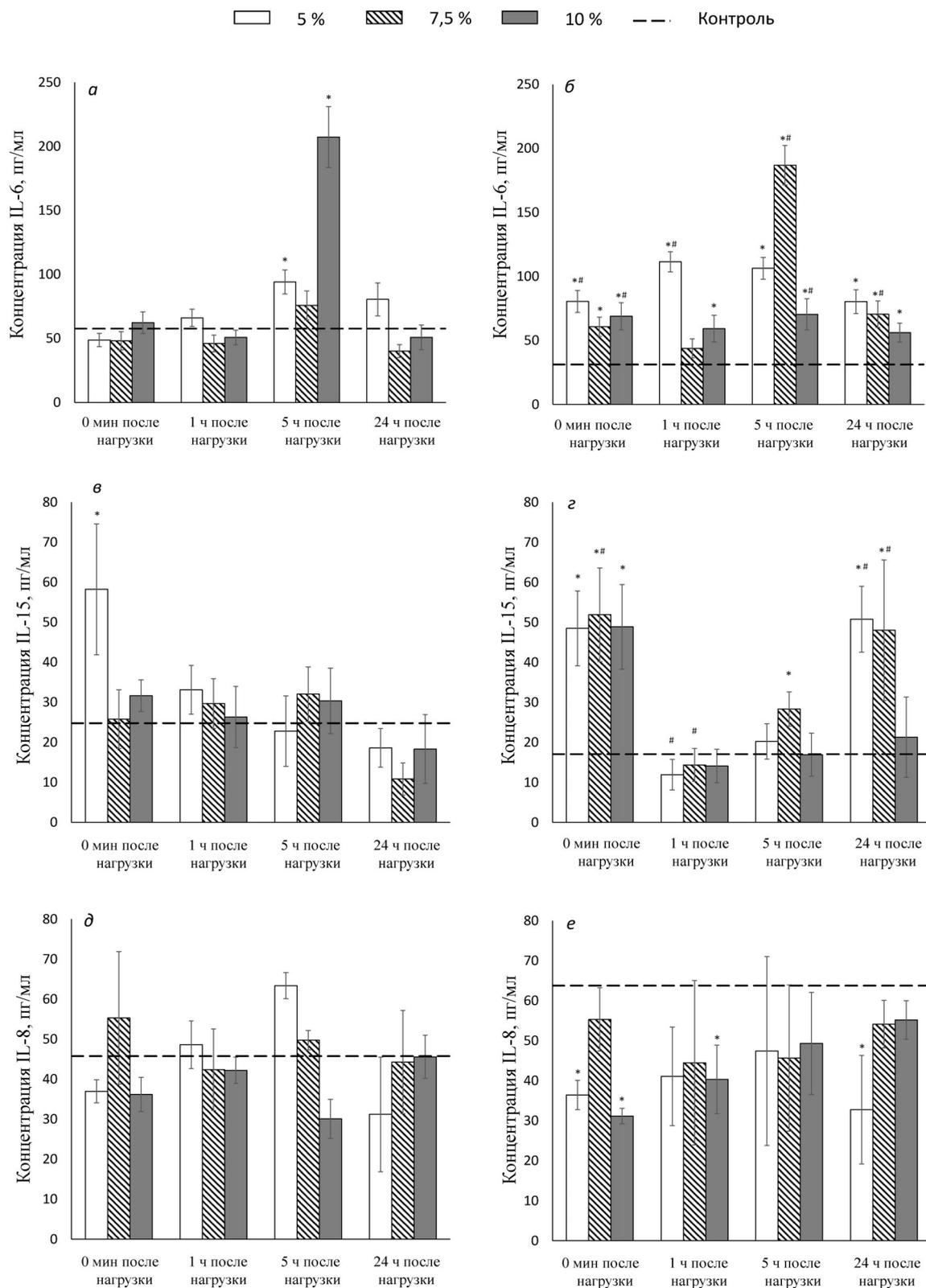


Рис. 2. Концентрация интерлейкинов в плазме крови мышей после динамической нагрузки. *а, в и д* – Нетренированные животные, *б, г и е* – тренированные животные. Сверху указаны величины дополнительной нагрузки (утяжеления) в процентах от массы тела. Представлены средние значения ± SEM (пг/мл). Обозначения: * $p_1 < 0,05$ – достоверность различий соответствующего показателя по сравнению с контролем; # $p_2 < 0,05$ – достоверность различий между тренированными и нетренированными животными

31,16 ± 1,93 пг/мл с утяжелением 10% (4); (1–4) – здесь и далее обозначены номера групп, для которых ниже указан уровень значимости p); $p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,05$; $p_{1-4} < 0,01$; $p_{2-3} < 0,01$; $p_{2-4} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,01$).

На рис. 3 представлены данные об изменении содержания интерлейкинов в плазме у тренированных и нетренированных мышей в различные сроки после принудительной статической нагрузки (вис на сетке). Продукция IL-6 у нетренированных животных в этом случае достоверно усиливалась сразу после нагрузки, причем увеличение было пропорционально степени утяжеления.

Максимум концентрации достигался через 1–5 ч после нагрузки, к 24 ч наблюдалось значительное снижение, однако уровень IL-6 оставался несколько выше исходных значений. У тренированных животных исходный уровень данного цитокина в плазме был значительно ниже (12,58 ± 4,33 пг/мл против 57,6 ± 9,3 пг/мл – у нетренированных, $p < 0,01$). Прирост после статических нагрузок в группе тренированных животных был выражен в меньшей степени.

Без утяжеления он регистрировался через 5 ч после нагрузки, с утяжелением – сразу после нагрузки. Максимум концентрации IL-6 в группе без утяжеления регистрировался через 5 ч после нагрузки и сохранялся на этом уровне до 24 ч, в группе с утяжелением 7,5% – через 1–5 ч, в группе с утяжелением 10% – через 5 ч. Через 24 ч после нагрузки концентрация IL-6 в плазме снижалась, а в группе с утяжелением 10% достигала фоновых значений (рис 2).

Концентрация IL-15 в плазме после статических нагрузок у нетренированных животных изменялась не столь значительно, сразу после нагрузки отмечалась тенденция к снижению концентрации данного цитокина, однако через час в группе без утяжеления она сменялась ростом – максимум достигался через 5 ч, после чего опять регистрировалось снижение – через 24 ч концентрация во всех группах была вдвое ниже исходного уровня (рис. 3).

В группе мышей, подвергавшихся ежедневным тренировочным статическим нагрузкам в течение 4-х недель, на фоне исходно сниженной до 14,27 ± 3,62 пг/мл ($p < 0,05$) концентрации IL-15 в плазме отмечался ее прирост непосредственно после однократной нагрузки у всех мышей, но максимальным он был в группе без утяжеления. Однако уже через 5 ч после нагрузки концентрация IL-15 в плазме значительно снижалась, постепенно достигая фоновых значений (рис. 3).

В отличие от динамических нагрузок, которые практически не влияли на концентрацию IL-8 в плазме у нетренированных мышей, сразу после статических нагрузок мы наблюдали вы-

раженный прирост концентрации данного цитокина в плазме у всех групп мышей, однако в группах с утяжелением он был выражен в меньшей степени. Максимум достигался сразу после нагрузок, и хотя через 5 ч отмечалось снижение концентрации, она оставалась существенно выше фоновых значений до 24 ч эксперимента (рис. 2). После 4-х недель ежедневных статических нагрузок фоновая концентрация данного интерлейкина в плазме возрастала до 120,95 ± 30,62 пг/мл ($p < 0,001$) (рис. 3). После однократной статической нагрузки у всех тренированных мышей мы наблюдали существенный прирост концентрации IL-8 в плазме сразу после нагрузки, который не зависел от степени утяжеления. Повышенная концентрация сохранялась на прежнем уровне в течение 24 ч, в группе без утяжеления дополнительный прирост концентрации был зарегистрирован через 5 ч, в других группах такого не отмечалось.

Исследование действия физической нагрузки на концентрацию одновалентных ионов в мышцах до и после нагрузки. Проведя исследование действия физической нагрузки на концентрацию одновалентных ионов в мышцах до и после нагрузки, мы не обнаружили различий в содержании внутриклеточного Na^+ и K^+ в *m. soleus* и *m. biceps* животных контрольной группы. На рис. 4, а представлены значения внутриклеточного содержания Na^+ в зависимости от характера и интенсивности нагрузки у тренированных и нетренированных мышей. Содержание внутриклеточного Na^+ и K^+ в группах нетренированных животных в состоянии покоя было ниже, чем у тренированных мышей. Хронические нагрузки динамического характера сопровождались возрастанием концентрации внутриклеточного Na^+ в большей степени, чем статические. Влияние двух типов хронических нагрузок на концентрацию внутриклеточного K^+ в клетках скелетных мышц не различалось.

Концентрация внутриклеточного Na^+ в мышцах в группе тренированных животных, подвергавшихся динамической нагрузке с малыми утяжелениями, была выше, чем у тренированных животных. В то же время после нагрузки с утяжелением в 10% содержание ионов Na^+ практически не изменялось. Сходные результаты были получены и в группе животных, подвергавшихся статическим нагрузкам.

Необходимо отметить, что содержание ионов Na^+ у тренированных мышей было выше, чем у нетренированных. При этом содержание ионов Na^+ у группы, подвергавшейся динамической нагрузке, численно выше по всем подгруппам, чем у группы, подвергавшейся статической нагрузке.

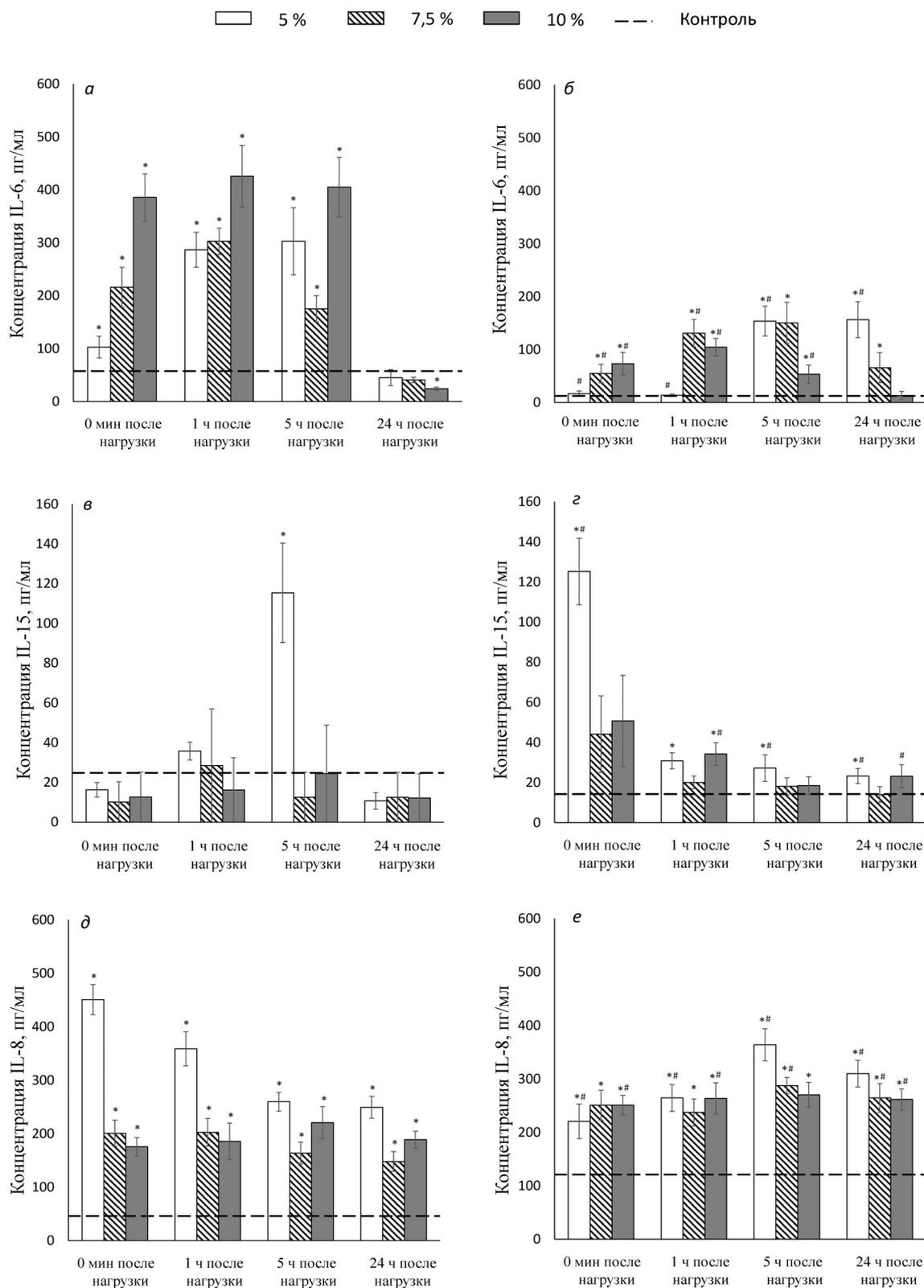


Рис. 3. Концентрация интерлейкинов в плазме крови мышей после статической нагрузки. *а, в и д* – Нетренированные животные, *б, г и е* – тренированные животные. Сверху указаны величины дополнительной нагрузки (утяжеления) в процентах от массы тела. Представлены средние значения \pm SEM (пг/мл). Обозначения: * $p_1 < 0,05$ – достоверность различий соответствующего показателя по сравнению с контролем; # $p_2 < 0,05$ – достоверность различий между тренированными и нетренированными животными

Содержание внутриклеточного K^+ в мышцах в группах нетренированных животных, подвергшихся однократной динамической или статической нагрузке, было ниже, чем у животных из контрольной группы (не подвергавшихся какой-либо нагрузке) (рис. 4, б). Существенное всего уровень K^+ в мышцах снизился в подгруппе после нагрузки без утяжеления, в то время как наименьшее снижение произошло в подгруппе после нагрузки в 10%. Уменьшение содержания K^+ в мышцах после статической нагрузки было выражено в большей степени, чем после динамической. Были выявлены статистически значимые различия в содержании ионов K^+ в мышцах между группами нетренированных и тренированных животных, подвергшихся как динамической, так и статической нагрузке. Необходимо отметить, что содержание ионов K^+ в мышцах у нетренированной группы снизилось сильнее, чем у тренированной.

Выраженное увеличение внутриклеточного соотношения Na_i^+/K_i^+ в мышцах было зарегистрировано как после динамических, так и после статических нагрузок, причем при высоких величинах утяжеления оно было выражено в меньшей степени (рис. 4, в). Уровень внутриклеточного соотношения Na_i^+/K_i^+ в мышцах в группе, подвергавшейся динамической нагрузке, выше, чем у группы, подвергавшейся статической нагрузке.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты позволяют сделать три основных вывода. Во-первых, влияние статических и динамических нагрузок на содержание в плазме цитокинов значительно различается. Длительные динамические упражнения вызывают увеличение содержания ИЛ-6 в плазме нетренированных мышцей. Это согласуется с данными ряда публикаций [5, 6, 41], в которых исследовалось содержание ИЛ-6 в плазме у спортсменов – бегунов. В отличие от динамических, статические нагрузки оказывают выраженное влияние на концентрацию всех исследованных миокинов.

Во-вторых, как динамические, так и статические нагрузки по-разному влияют на содержание цитокинов в плазме крови нетренированных и тренированных животных. Так, в плазме у тренированных животных после динамической нагрузки наблюдался значительный прирост концентрации ИЛ-15 и снижение концентрации ИЛ-8, тогда как у нетренированных животных подобная реакция на однократную динамическую нагрузку отсутствовала. Эти факты можно объяснить адаптационными изменениями в ор-

ганизме животных, вызванными регулярными физическими нагрузками [13, 42].

В-третьих, как динамические, так и статические нагрузки влияют на содержание одновалентных катионов в клетках скелетных мышц, вызывая увеличение внутриклеточного соотношения Na_i^+/K_i^+ , однако при динамической нагрузке это эффект выражен в большей степени. При этом содержание внутриклеточного Na^+ и K^+ в группах нетренированных животных в состоянии покоя было ниже, чем у тренированных мышцей.

Особенности влияния динамической и статической нагрузки на продукцию миокинов у нетренированных и тренированных животных могут быть связаны с различиями в клеточном составе мышц. Скелетная мышца весьма гетерогенна – кроме миоцитов, она содержит целый ряд клеток – фибробласты, перициты, адипоциты, чей вклад в общий объем производства цитокинов изучен недостаточно [42]. Относительное содержание этих клеток, а также их воздействие на вызванную физической нагрузкой продукцию цитокинов может изменяться в результате регулярных физических нагрузок. В дополнение к гетерогенности ткани было показано, что скелетные миоциты могут быть подразделены на 3 различных фенотипа, каждый из которых имеет свои особенности биоэнергетических механизмов [43, 44].

Еще один фактор, обеспечивающий описанные различия, может быть связан с особенностями транскрипционных механизмов. Показано, что транскрипционные изменения при сокращении мышц наиболее выражены в быстро сокращающихся мышечных волокнах типа IIa [45], что также, несомненно, отражается на интенсивности продукции миокинов. Фактор, индуцируемый гипоксией 1 альфа (HIF-1 α), cAMP- и Ca_i^{2+} -зависимые протеинкиназы, а также соотношение концентраций одновалентных катионов ($[Na^+]_i/[K^+]_i$) обеспечивают передачу сигналов и участвуют в образовании транскрипционных связей в клетках скелетных мышц [31, 39, 46, 47]. HIF-1 α транслоцируется в ядро, где образует комплекс HIF-1 α /HIF-1 β и триггеры транскрипции десятков генов, в том числе фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS) [48]. Важно отметить, что в отличие от динамической нагрузки, статические нагрузки приводят к окклюзии кровеносных сосудов и локальной гипоксии, что сопровождается накоплением mRNA фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и эндотелиальной синтазы окиси азота в скелетной мышце крысы [49]. Однако роль этого пути в регулировании продукции цитокинов еще не изучена.

Возбуждение миоцитов сопровождается изменением трансмембранного градиента одно-

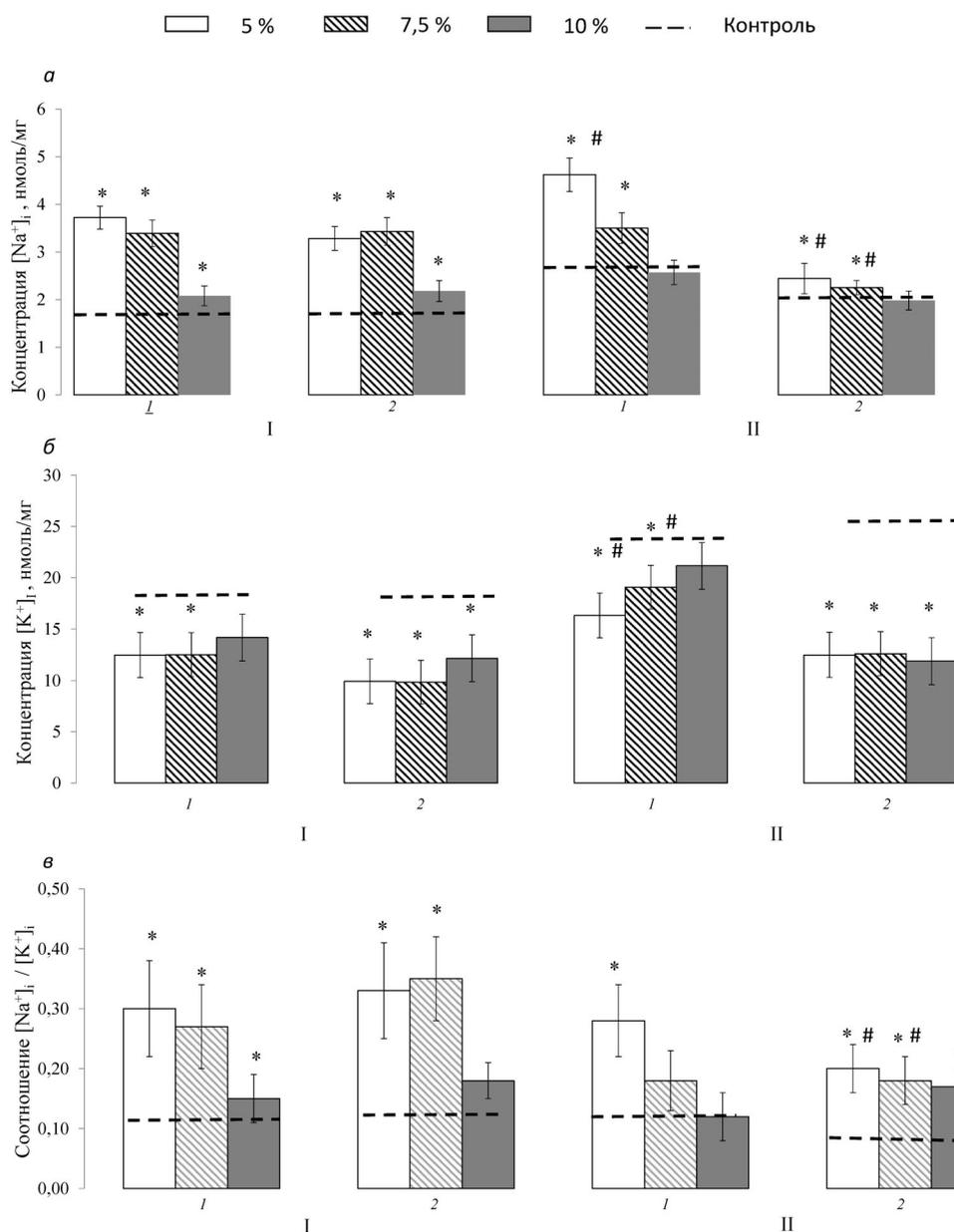


Рис. 4. Величины внутриклеточных концентраций Na^+ (а), K^+ (б) и соотношения Na^+/K^+ (в) после динамической (1) и статической (2) нагрузки у нетренированных (I) и тренированных (II) мышей. Вверху указаны величины дополнительной нагрузки (утяжеления) в процентах от массы тела. Концентрация нормирована на влажный вес мышцы. Представлены средние значения \pm SEM. Обозначения: * $p_1 < 0,05$ – достоверность различий соответствующего показателя по сравнению с контролем; # $p_2 < 0,05$ – достоверность различий между тренированными и нетренированными животными

лентных катионов вследствие притока Na^+ и оттока K^+ через потенциал-зависимые и Ca^{2+} -чувствительные ионные каналы. В некоторых типах клеток повышение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ приводило к экспрессии mRNA ряда цитокинов, в том числе *IL-6* [50, 51]. Это позволяет предположить, что увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ является фактором, стимулирующим продукцию миокинов. Этот процесс может опосредоваться возрастанием концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитоплазме за счёт активации по-

тенциал-чувствительных Ca^{2+} -каналов и/или $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена.

Ранее для оценки относительного вклада Ca_i^{2+} -опосредованного и Ca_i^{2+} -независимого сигнальных путей мы сравнили транскриптомные изменения при увеличении соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в клетках, обеднённых Ca^{2+} , и обнаружили увеличение количества специфических $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов [52]. Среди $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов, активируемых независимо от наличия хелато-

ров Ca^{2+} , был обнаружен ген миокина, *IL-6*. Недавно также было выявлено, что внеклеточные хелаторы Ca^{2+} значительно увеличивают проницаемость мембраны для одновалентных ионов, что приводит к повышению внутриклеточного соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [53]. Ранее мы также показали, что в клетках гладких мышц сосудов транскриптомные изменения, индуцированные гипоксией, по меньшей мере частично вызваны *HIF-1 α* -независимыми, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -опосредованными, транскрипционными связями [54].

Однако молекулярная природа сенсоров, посредством которых осуществляется регуляция процессов транскрипции и трансляции внутриклеточными Na^+ и K^+ , до сих пор остаётся предметом дискуссии [55]. В данном аспекте интересен тот факт, что увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в цитоплазме клеток скелетных мышц при сокращении сопровождается увеличением активности $\alpha 2 \text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [56], которая способна частично нивелировать этот эффект благодаря высокому сродству этой изоформы фермента к $[\text{Na}^+]_i$ [57].

Подводя итог сказанному, следует отметить, что спектр вырабатываемых миокинов зависит от характера нагрузок и уровня предварительной тренировки. Динамические и статические нагрузки по-разному влияют на содержание миокинов в плазме крови нетренированных и предварительно тренированных экспериментальных животных. Обнаруженные различия могут иметь в своей основе целый ряд механизмов. Клеточный состав скелетных мышц и фенотипические особенности мышечных волокон, изменяясь в результате регулярных тренировок, могут модифицировать процессы продукции

миокинов. Однако обнаруженное влияние физических нагрузок на диссипацию трансмембранных градиентов одновалентных катионов позволяет предположить, что определенную роль в этом могут играть $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -зависимые механизмы запуска транскрипции генов.

Модификация этих механизмов под влиянием физических нагрузок различного характера и интенсивности представляет значительный интерес, так как является перспективным путем воздействия на процессы метаболизма как на клеточном, так и на системном уровнях, что весьма актуально как для повышения спортивных результатов, так и для коррекции метаболических расстройств при целом ряде социально значимых заболеваний.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10026-П).

Благодарности. Авторы приносят благодарность профессору Александру Чибалину (Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция) за высказанные ценные идеи при обсуждении результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом биологического института Томского государственного университета (протокол № 32 от 19 декабря 2019 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Amano, Y., Nonaka, Y., Takeda, R., Kano, Y., and Hoshino, D. (2020) Effects of electrical stimulation-induced resistance exercise training on white and brown adipose tissues and plasma meteorin-like concentration in rats, *Physiol. Rep.*, **16**, e14540, doi: 10.14814/phy2.14540.
3. Drenth, J. P., Van Uum, S. M., Van Deuren, M., Pesman, G., Van der Ven-Jongekrijg, J., and Van der Meer, J. M. (1985) Endurance run increases circulation IL-6 and IL-1ra but downregulates *ex vivo* TNF-alpha and IL-1beta production, *J. Appl. Physiol.*, **79**, 1497-1503, doi: 10.1152/JAPPL.1995.79.5.1497.
4. Romagnoli, C., Zonefrati, R., and Sharma, P. (2020) Characterization of skeletal muscle endocrine control in an *in vitro* model of myogen, *Calcif. Tissue Int.*, **107**, 18-30, doi: 10.1007/s00223-020-00678-3.
5. Barbalho, S. M., Flato, U. A. P., Tofano, R. J., de Alvares Goulart, R., Guiguer, E. L., et al. (2020) Physical exercise and myokines, *Int. J. Molec. Sci.*, **21**, 3607, doi: 10.3390/ijms21103607.
6. Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., and Klarlund Pedersen, B. (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6, *J. Physiol.*, **529**, 237-242, doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00237.x.
7. Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., et al. (2001) Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content, *FASEB J.*, **14**, 2748-2750, doi: 10.1096/fj.01-0507fje.
8. Nedachi, T., Fujita, H., and Kanzaki, M. (2008) Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1191-E1204, doi: 10.1152/ajpendo.90280.2008.
9. Lambernd, S., Taube, A., Schober, A., Platzbecker, B., Görgens, S. W., et al. (2012) Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signaling pathways, *Diabetologia*, **55**, 1128-1139, doi: 10.1007/s00125-012-2454-z.
10. Nikolic, N., Bakke, S. S., Kase, E.T., Rudberg, I., Halle, I. F., et al. (2012) Electrical pulse stimulation of cul-

- tured human skeletal muscle cells as an *in vitro* model of exercise, *PLoS One*, **7**, e33203, doi: 10.1371/journal.pone.0033203.
11. Scheler, M., Irmeler, M., Lehr, S., Hartwig, S., Staiger, H., et al. (2013) Cytokine response of primary human myotubes in an *in vitro* exercise model, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **305**, C877-C886, doi: 10.1152/ajpcell.00043.2013.
 12. Ahn, N., and Kim, K. (2020) Effects of aerobic and resistance exercise on myokines in high fat diet-induced middle-aged obese rats, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **17**, 2685, doi: 10.3390/ijerph17082685.
 13. Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A. (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6, *Physiol. Rev.*, **88**, 1379-1406, doi: 10.1152/physrev.90100.2007.
 14. Iizuka, K., Machida, T., and Hirafuji, M. (2014) Skeletal muscle is an endocrine organ, *J. Pharmacol. Sci.*, **125**, 125-131, doi: 10.1254/jphs.14r02cp.
 15. Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, 457-465, doi: 10.1038/nrendo.2012.49.
 16. Laurens, C., Bergouignan, A., and Moro, C. (2020) Exercise-released myokines in the control of energy metabolism, *Front. Physiol.*, **11**, 91, doi: 10.3389/fphys.2020.00091.
 17. Kapilevich, L. V., Zakharova, A. N., Kabachkova, A. V., Kironenko, T. A., and Orlov, S. N. (2017) Dynamic and static exercises differentially affect plasma cytokine content in elite endurance- and strength-trained athletes and untrained volunteers, *Front. Physiol.*, **8**, 35, doi: 10.3389/fphys.2017.00035.
 18. Kapilevich, L. V., Kironenko, T. A., Zakharova, A. N., Kabachkova, A. V., and Orlov, S. N. (2017) Level of interleukins IL-6 and IL-15 in blood plasma of mice after forced swimming test, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**, 10-13, doi: 10.1007/s10517-017-3725-y.
 19. Jurkat-Rott, K., Fauler, M., and Lehmann-Horn, F. (2006) Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 275-290, doi: 10.1007/s10974-006-9088-z.
 20. Sejersted, O. M., and Sjogaard, G. (2000) Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise, *Physiol. Rev.*, **80**, 1411-1481, doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1411.
 21. McDonough, A. A., Thompson, C. B., and Youn, J. H. (2002) Skeletal muscle regulates extracellular potassium, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*, **282**, F967-F974, doi: 10.1152/ajprenal.00360.2001.
 22. McKenna, M. J., Bangsbo, J., and Renaud, J. M. (2008) Muscle K⁺, Na⁺, and Cl⁻ disturbances and Na⁺-K⁺ pump inactivation: implications for fatigue, *J. Appl. Phys.*, **104**, 288-295, doi: 10.1152/jappphysiol.01037.2007.
 23. Murphy, K. T., Nielsen, O. B., and Clausen, T. (2008) Analysis of exercise-induced Na⁺-K⁺ exchange in rat skeletal muscle, *Exp. Physiol.*, **93**, 1249-1262, doi: 10.1113/expphysiol.2008.042457.
 24. Cairns, S. P., and Lindinger, M. I. (2008) Do multiple ionic interactions contribute to skeletal muscle fatigue? *J. Physiol.*, **586**, 4039-4054, doi: 10.1113/jphysiol.2008.155424.
 25. Orlov, S. N., Koltsova, S. V., Kapilevich, L. V., Gusakova, S. V., and Dulin, N. O. (2015) KCC1 and NKCC2: the pathogenic role of cation-chloride cotransporters in hypertension, *Genes Dis.*, **2**, 186-196, doi: 10.1016/j.gendis.2015.02.007.
 26. Danilov, K., Sidorenko, S., Milovanova, K., Klimanova, E., Kapilevich, L., and Orlov, S. (2017) Electrical pulse stimulation decreases electrochemical Na⁺ and K⁺ gradients in C2C12 myotubes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 875-878, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.133.
 27. Farmawati, A., Kitajima, Y., Nedachi, T., Sato, M., Kanzaki, M., and Nagatomi, R. (2013) Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes, *Endocr. J.*, **60**, 137-147, doi: 10.1507/endocrj.ej12-0316.
 28. Smolyaninova, L.V., Koltsova, S. V., Sidorenko, S. V., and Orlov, S. N. (2017) Augmented gene expression triggered by Na⁺,K⁺-ATPase inhibition: role of Ca²⁺-mediated and -independent excitation-transcription coupling, *Cell Calcium*, **68**, 5-13, doi: 10.1016/j.ceca.2017.10.002.
 29. Sidorenko, S., Klimanova, E., Milovanova, K., Lopina, O. D., Kapilevich, L. V., et al. (2018) Transcriptional changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of Ca²⁺-mediated and Ca²⁺-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72-86, doi: 10.1016/j.ceca.2018.09.007.
 30. Kapilevich, L. V., Kironenko, T. A., Zaharova, A. N., Kotelevtsev, Y. V., Dulin, N. O., and Orlov, S. N. (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated excitation-transcription coupling, *Genes Dis.*, **2**, 328-336, doi: 10.1016/j.gendis.2015.10.001.
 31. Lauritzen, H. P., Brandauer, J., Schjerling, P., Koh, H. J., Treebak, J. T., et al. (2013) Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers *in vivo*, *Diabetes*, **62**, 3081-3092, doi: 10.2337/db12-1261.
 32. Kapilevich, L. V., Milovanova, K. G., Sidorenko, S. V., Fedorov, D. A., Kironenko, T. A., et al. (2020) Effect of dynamic and static loads on the concentration of sodium and potassium in murine skeletal muscles, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **169**, 1-4, doi: 10.1007/s10517-020-04811-y.
 33. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Tverskoi, A. M., Shiyani, A. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2019) Search for intracellular sensors involved in the functioning of monovalent cations as secondary messengers, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1280-1295, doi: 10.1134/S0006297919110063.
 34. Shiyani, A. A., Sidorenko, S. V., Fedorov, D., Klimanova, E. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2019) Elevation of intracellular Na⁺ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage, *Cell. Physiol. Biochem.*, **53**, 638-647, doi: 10.33594/000000162.
 35. Smolyaninova, L. V., Shiyani, A. A., Kapilevich, L. V., Lopachev, A. V., Fedorova, T. N., et al. (2019) Transcriptional changes triggered by ouabain in rat cerebellum granule cells: role of α3- and α1-Na⁺,K⁺-ATPase-mediated signaling, *PLoS One*, **14**, e0222767, doi: 10.1371/journal.pone.0222767.
 36. Lukaszuk, B., Bialuk, I., Górski, J., Zajaczkiewicz, M., Winnicka, M. M., and Chabowski, A. (2012) A single bout of exercise increases the expression of glucose but not fatty acid transporters in skeletal muscle of IL-6 KO mice, *Lipids*, **47**, 763-772, doi: 10.1007/s11745-012-3678-x.
 37. Bagmetova, V. V., Krivitskaya, A. N., Tyurenkov, I. N., Berestovitskaya, V. M., and Vasilyeva, O. S. (2012) The influence of fenibut and its salt with succinic acid on animals' resistance to forced dynamic and static physical loads, *Fundament. Res.*, **4**, 243-246.
 38. Wasinski, F., Bacurau, R. F., Moraes, M. R., Haro, A. S., Moraes-Vieira, P. M., et al. (2013) Exercise and caloric restriction alter the immune system of mice submitted to a high-fat diet, *Mediators Inflamm.*, **2013**, 395672, doi: 10.1155/2013/395672.
 39. Karkishchenko, V. N., Kapanadze, G. D., Dengina, S. E., and Stankova, N. V. (2011) Development of technique of assessment of physical endurance of small laboratory animals for investigation of adaptogenic activity of some therapeutic drugs, *Biomeditsina*, **1**, 72-74.
 40. Gundersen, K. (2011) Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **86**, 564-600, doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x.
 41. Fisher, C. P. (2006) Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise Immunol. Rev.*, **12**, 6-33.
 42. Peake, J. M., Gatta, P. D., Suzuki, K., and Nieman, D. C. (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal mus-

- cle cells: regulatory mechanisms and exercise effects, *Exercise Immunol. Rev.*, **21**, 8-25.
43. Fitts, R. H., and Widrick, J. J. (1996) Muscle mechanics: adaptations with exercise-training, *Exerc. Sport. Sci. Rev.*, **24**, 427-473.
 44. Dyakova, E. Y., Kapilevich, L. V., Shylko, V. G., Popov, S. V., and Anfinogenova, Y. (2015) Physical exercise associated with NO production: signaling pathways and significance in health and disease, *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 19, doi: 10.3389/fcell.2015.00019.
 45. Raue, U., Trappe, T. A., Estrem, S. T., Qian, H.-R., Helvering, L. M., et al. (2012) Transcriptomic signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults, *J. Appl. Physiol.*, **112**, 1625-1636, doi: 10.1152/jappphysiol.00435.2011.
 46. Kapilevich, L. V., D'Yakova, E. Yu., Nosarev, A. V., Zaitseva, T. N., Petlina, Z. R., et al. (2010) Effect of nano-disperse ferrite cobalt (CoFe₂O₄) particles on contractile reactions in guinea pigs airways, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **149**, 70-72.
 47. Kovalev, I. V., Baskakov, M. B., Medvedev, M. A., Minochenko, I. L., Kilin, A. A., et al. (2007) Na⁺,K⁺,2Cl(-)-cotransport and chloride permeability of the cell membrane in mezonon and histamine regulation of electrical and contractile activity in smooth muscle cells from the guinea pig ureter, *Ros. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova*, **93**, 306-317.
 48. Ke, Q., and Costa, M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1469-1480, doi: 10.1124/mol.106.027029.
 49. Rodriguez-Miguel, P., Lima-Cabello, E., Martinez-Florez, S., Almar, M., Cuevas, M. J., and González-Gallego, J. (2015) Hypoxia-inducible factor-1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase induced by eccentric exercise, *J. Appl. Physiol.*, **118**, 1075-1083, doi: 10.1152/jappphysiol.00780.2014.
 50. Koltsova, S. V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O. A., Tremblay, J., et al. (2012) Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for [Ca²⁺]_i-independent excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **7**, e38032, doi: 10.1371/journal.pone.0038032.
 51. Popov, D. V., Lysenko, E. A., Bokov, R. O., Volodina, M. A., Kurochkina, N. S., et al. (2018) Effect of aerobic training on baseline expression of signaling and respiratory proteins in human skeletal muscle, *Physiol. Rep.*, **6**, e13868, doi: 10.14814/phy2.13868.
 52. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Shagimardanova, E. I., and Volodina, M. A. (2019) Contactile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **316**, E605-E614, doi: 10.1152/ajpendo.00449.2018.
 53. Koltsova, S. V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2015) Transcriptomic changes in Ca²⁺-depleted cells: role of elevated intracellular [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio, *Cell Calcium*, **58**, 317-324, doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.009.
 54. Koltsova, S. V., Shilov, B., Burulina, J. G., Akimova, O. A., Mounisif, H., et al. (2014) Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **9**, e110597, doi: 10.1371/journal.pone.0110597.
 55. Orlov, S. N., and Hamet, P. (2015) Salt and gene expression: evidence for [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated signaling pathways, *Pflugers Arch.*, **467**, 489-498, doi: 10.1007/s00424-014-1650-8.
 56. Kravtsova, V. V., Petrov, A. M., Matchkov, V. V., Timonina, N. A., Zakyrganova, G. F., et al. (2016) Distinct α 2 Na,K-ATPase membrane pool are differently involved in early skeletal muscle remodeling during disuse, *J. Gen. Physiol.*, **147**, 175-188, doi: 10.1085/jgp.201511494.
 57. Matchkov, V. V., and Krivoi, I. I. (2016) Specialized functional diversity and interactions of Na,K-ATPase, *Front. Physiol.*, **7**, 179, doi: 10.3389/fphys.2016.00179.

INFLUENCE OF DYNAMIC AND STATIC LOADS ON THE CONCENTRATION OF MYOKINES IN PLASMA AND ON THE CONTENT OF SODIUM AND POTASSIUM IN THE SKELETAL MUSCLES OF MICE

T. A. Kironenko¹, K. G. Milovanova¹, A. N. Zakharova¹, S. V. Sidorenko²,
E. A. Klimanova^{1,2}, E. Yu. Dyakova¹, A. A. Orlova¹, E. S. Negodenko¹,
Yu. G. Kalinnikova¹, S. N. Orlov^{1,2}, and L. V. Kapilevich^{1*}

¹ National Research Tomsk State University, 634050 Tomsk, Russia, E-mail: kapil@yandex.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Modification of the production of cytokines under the influence of physical activity is of considerable interest, since it is a promising way of correcting metabolic processes at both the cellular and systemic levels. The content of IL-6, IL-8, and IL-15 in plasma and monovalent cations in skeletal muscle in mice was studied at different times after static and dynamic loads, taking into account their weighting and preliminary training. Long-term dynamic exercises cause an increase in the content of IL-6 and a decrease in IL-15 in the plasma of intact mice, without affecting the concentration. In trained mice, the effects of a single load on the concentration of IL-6 and IL-15 in plasma were enhanced, and a decrease in the concentration of IL-8 was also noted. Unlike dynamic, static loads have a similar, but more pronounced effect on the concentration of IL-6 and IL-15 in plasma. However, the concentration of IL-8 in response to static load increased significantly. Preliminary workouts reinforced the described reactions for all myokines studied. The multidirectional effect of the dynamic load (swimming) on the contents of intracellular sodium (increase) and potassium (decrease) in the *mouse soleus* was shown. It was found for the first time that a similar phenomenon is observed under static load (hanging on a grid) in *mouse biceps* mice and does not reliably depend on preliminary training of experimental animals. Possible mechanisms providing the regulation of cytokine secretion after exercise are discussed, including the [Na⁺]_i/[K⁺]_i-dependent mechanism for triggering gene transcription.

Keywords: physical activity, myokines, ions, Na⁺/K⁺-ATPase, transcription, translation

УДК 617.713

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ РОГОВИЦЫ

© 2021 Г.С. Батурина^{1,2}, Л.Е. Каткова¹, И.Г. Пальчикова^{2,3},
Н.Г. Колосова¹, Е.И. Соленов^{1,2,4*}, И.А. Искаков⁵

¹ Федеральний исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: eugsol@bionet.nsc.ru

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

³ Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения
Российской академии наук, 630058 Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный технический университет, 630087 Новосибирск, Россия

⁵ НМИЦ Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова»
Минздрава России, Новосибирский филиал, 630096 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28.07.2020

После доработки 16.10.2020

Принята к публикации 16.10.2020

Одной из основных причин слепоты в мире являются заболевания роговицы, лечение тяжёлых форм которых основано на кератопластике. Успех лечения зависит от жизнеспособности трансплантата роговицы, определяющейся эффективностью восстановления функций эндотелия после консервации, что делает актуальной разработку методов объективной оценки сохранности эндотелия и совершенствования консервационных сред. Проведено исследование влияния гипотермической консервации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы, устанавливающуюся в них после прекращения консервации, и зависимости этого параметра от присутствия в консервационной среде митохондриального антиоксиданта SkQ1. Оценивали влияние SkQ1 на внутриклеточную концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы глаза свиньи после гипотермической консервации при 4 °С длительностью 1, 5 и 10 дней в стандартном растворе Eusol-C. Концентрацию внутриклеточного натрия определяли с помощью флуоресцентного красителя Sodium Green в препаратах клеток эндотелия. Флуоресцентные изображения клеток анализировали, используя оригинальную программу «CytoDynamics». В контрольных образцах после 10 дней гипотермической консервации выявлено значительное повышение концентрации внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы и снижение проницаемости для натрия их плазматических мембран. Консервация роговицы в присутствии 1 нМ SkQ1 приводила к установлению более низкого по сравнению с контролем уровня равновесной концентрации внутриклеточного натрия при температуре 37 °С, снижения проницаемости плазматических мембран не наблюдалось. Таким образом, SkQ1 повышает способность клеток эндотелия к восстановлению концентрации внутриклеточного натрия, что делает перспективным его использование для повышения сохранности функциональной компетентности клеток эндотелия роговицы при гипотермической консервации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндотелий роговицы, гипотермическая консервация, SkQ1, внутриклеточный натрий.

DOI: 10.31857/S032097252103012X

ВВЕДЕНИЕ

Пятое место в мире среди основных причин слепоты занимают заболевания роговицы, лечение тяжёлых форм которых основано на кератопластике [1]. Успешность кератопластики (сквозной, задней послойной) во многом зависит от функционального состояния эндотелия,

повреждение которого приводит к отеку роговицы, снижению её прозрачности и снижению жизнеспособности трансплантата. Эффективность восстановления роговичного трансплантата после операции зависит от интенсивности транспорта электролитов и воды через эндотелий роговицы, важной функцией которого является поддержание осмотического равновесия матрикса роговицы [2, 3]. Необходимость восстановления функциональных возможностей эндотелия после периода консервации делает актуальными исследования, направленные на совершенствование консервационных сред и

Принятые сокращения: ОИ – области интереса; $[Na^+]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов натрия; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний.

* Адресат для корреспонденции.

разработку методов объективной оценки сохранности транспортных функций клеток эндотелия роговицы. Методы определения жизнеспособных клеток с применением красителя «трипановый синий» или тест на фрагментацию ДНК (TUNEL assay) не позволяют оценивать собственно функциональность транспортных механизмов клеток эндотелия [4, 5]. В молекулярный механизм транспорта на стороне, обращённой к матриксу роговицы, входят: Na/K-АТФаза, электрогенный натрий-бикарбонат котранспортер ($1\text{Na}^+/2\text{HCO}_3^-$, *SLC4A4*, NBCe1), $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC), ионообменники: хлорид-бикарбонат ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, *SLC4A2*, AE2) и натрий-протонный (Na^+/H^+ , *SLC9A6*, NHE1) [6, 7]. На апикальной поверхности идентифицированы хлоридные каналы CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) и CaCC (Calcium activated Chloride Channel – CLCA1), которые, по-видимому, не вносят значительного вклада в общий транспорт и активируются только в стрессовых ситуациях [8]. Каналы проницаемы и для бикарбонат-иона в соотношении 4/1 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$). В эндотелиальных клетках отмечают высокую плотность митохондрий. АТФ, производимый в клетках, является не только субстратом для Na/K-АТФазы, но и сигнальным фактором, который, наряду с внутриклеточным кальцием, через пуриnergические рецепторы способен повышать проводимость апикальной поверхности для HCO_3^- , активируя CaCC [9]. В механизме трансэпителиального переноса ионов и воды основным источником энергии для векторного транспорта является Na/K-АТФаза, создавая, наряду с другим электрогенным транспортером, NBCe1, градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране этих клеток, что является вторичным источником энергии для выполнения этими клетками функции «насоса». В этой связи естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как результат баланса активности натрий-калиевого насоса и потоков через каналы и ионообменники плазматической мембраны клетки [10]. Исследование динамики снижения клеточного объёма эндотелия роговицы, а также содержания внутриклеточного натрия в клетках эндотелия после прекращения гипотермической консервации даёт объективное представление о транспортной компетентности этих клеток [11].

В данной работе проведено исследование влияния гипотермической консервации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия, устанавливающуюся в клетках эндотелия роговицы после повышения температуры до 37 °С. Кроме того, была проведена оценка зави-

симости этого параметра от присутствия в консервационной среде митохондриального антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1). SkQ1 в форме глазных капель «Визомитин» используется для лечения синдрома «сухого глаза», оказывает мягкий противовоспалительный эффект и ускоряет регенерацию роговицы [12, 13]. Показано, что SkQ1 способен снижать связанные с ишемией и реперфузией повреждения тканей [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на дисках роговицы свиньи (*sus scrofa domesticus*). Трепанацию проводили с помощью трепана диаметром 8 мм через 6–8 ч после забоя животных (свинокомплекс «АО «Кудряшовское»», с. Криводановка, Новосибирская обл.). Иссечённые диски роговицы помещали в чашки Петри, заполненные средой Eusol-C («Alchimia», Италия) и на льду транспортировали в лабораторию.

Гипотермическая консервация. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы свиньи на способность эндотелиоцитов восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия ($[\text{Na}^+]_i$) после прекращения гипотермии. Препараты (диски) роговицы инкубировали в консервационной среде Eusol-C в течение 1, 5 и 10 дней при 4 °С. В экспериментальных группах в среде присутствовал 1 нМ SkQ1 (использовали глазные капли «Визомитин», предоставленные ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»). Диски инкубировали индивидуально, для каждого временного интервала использовали 4–5 дисков.

Препарат переживающих клеток. Препарат переживающих клеток эндотелия роговицы получали переносом клеток на покровное стекло. С этой целью диск роговицы инкубировали в растворе 1 мг/мл коллагеназы («Sigma», США) в PBS (138 мМ NaCl, 4,7 мМ Na_2HPO_4 , 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ KH_2PO_4 , 0,5 мМ MgCl_2 , 5,5 мМ глюкоза, 1,0 мМ CaCl_2) при 37 °С 30 мин, затем делали отпечаток эндотелия на покровное стекло, покрытое 0,1%-ным (w/v) раствором полилизина («Sigma», США) в воде. Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращённых базальной стороной в сторону омывающего раствора.

Микроскопия. Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor 25x/0,8 M27, «Zeiss», Германия). Объем камеры составлял ~50 мкл, скорость протекания раствора 25 мл/мин, поддерживаемая темпера-

тура $36,80 \pm 0,2$ °C. Флуоресцентные изображения клеток записывали с помощью камеры AxioCam H5m, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 («Zeiss», Германия). Регистрацию изображений производили с интервалом 30 с на протяжении всего эксперимента при низкой интенсивности возбуждающего света, что позволяло избежать выгорания флуорофора во время эксперимента. Серии цифровых изображений регистрировали с дигитализацией 12 бит в режиме линейного преобразования падающей интенсивности и сохраняли на компьютере в формате TIFF. Измерения интенсивности флуоресценции проводили с помощью программного пакета «CytoDynamics» с записью результатов измерения динамики интенсивностей индивидуальных клеток в формате таблиц Excel (Программа для ЭВМ 2016612766 РФ).

Измерение концентрации внутриклеточного натрия. Концентрацию $[Na^+]_i$ в клетках определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя Sodium Green AM («Molecular Probes», США), согласно установленному ранее протоколу [15].

Сигнал калибровали, помещая клетки в фосфатный солевой буфер (PBS) с различной концентрацией Na^+ (147,4 мМ, и 10 мМ в присутствии 100 ед./мл Na^+ -ионофора Nystatin («AppliChem», Германия). Гипонатриевый раствор (10 мМ NaCl) готовили на основе изотонического PBS, в котором часть натрия замещали на 137,4 мМ n-methyl-D-glucamine («ICN Biomedicals», США). Для измерения покровное стекло с клетками эндотелия переносили в раствор PBS. Клетки загружали флуоресцентным красителем Sodium Green AM (10 мкМ, 40 мин,

37 °C). Стекла с клетками помещали в камеру флуоресцентного микроскопа. В ходе эксперимента первые 5 мин (период I) клетки находились при температуре 10 °C, затем 5 мин – при температуре 37 °C (период II) и последующие 5 мин (период III) – в среде PBS, содержащего 10 мМ Na^+ при температуре 37 °C в присутствии 100 ед./мл Nystatin (рис. 1). Для определения проницаемости плазматической мембраны для ионов натрия создавали ступенчатый градиент натрия сменой среды, содержащей 147,4 и 10 мМ натрия. Экспериментальные записи изменения флуоресценции Sodium Green для оценки скорости изменения внутриклеточного натрия нормировали по амплитуде и находили коэффициент линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции, как это описано нами ранее [16].

Анализ экспериментальных данных по динамике внутриклеточной концентрации ионов Na^+ с целью получения количественных оценок проницаемости мембраны клеток для ионов натрия производили с помощью математической модели главных клеток собирательных трубок почки, разработанной нами ранее [17]. Усреднённые профили флуоресценции клеток в экспериментальных группах ($M \pm SD$) строили, рассчитывая средние значения соответствующих точек профилей области интереса (ОИ). В каждой экспериментальной группе рассчитывали стационарную концентрацию натрия в клетках при 37 °C в интервале II, исходя из средних значений интенсивности флуоресценции на квазистационарных участках профиля, соответствующих интервалам I и III, и внутриклеточной концентрации натрия, равной 147,4 мМ при

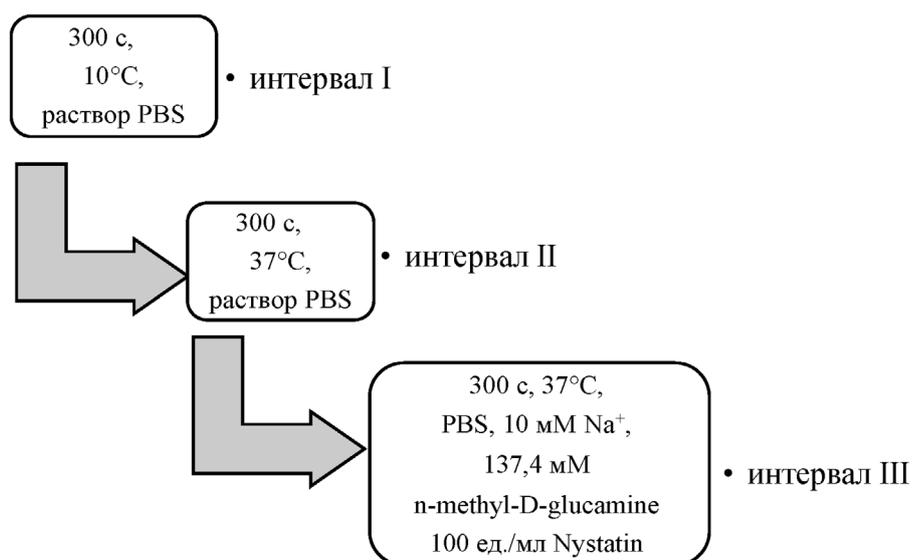
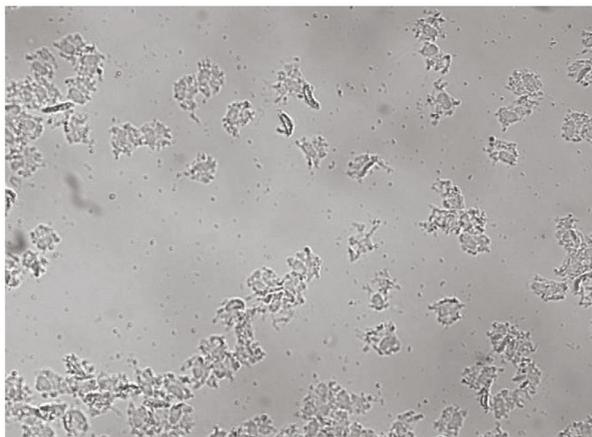
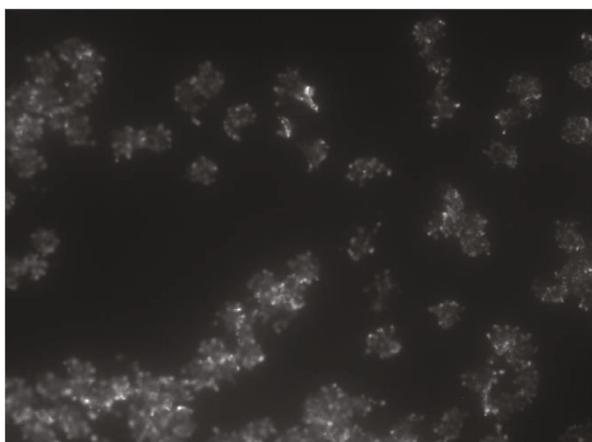


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению стационарной концентрации внутриклеточного натрия

а



б



в

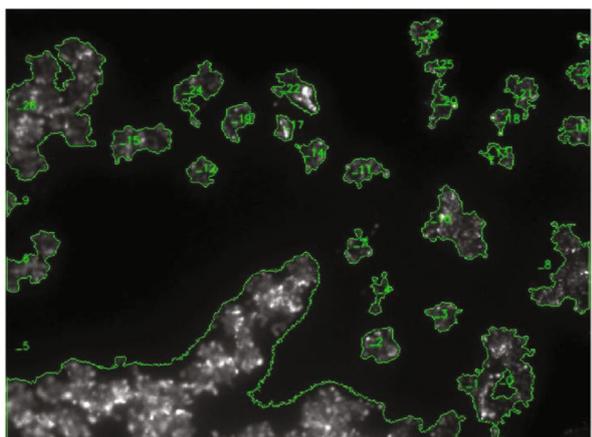


Рис. 2. Фрагмент препарата переживающих клеток эндотелия роговицы. ($\times 25/0,8$ Plan-apochromat, Zeiss). а – Фазово-контрастное изображение; б – флуоресцентное изображение; в – флуоресцентное изображение с выделенными зонами интереса. (С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

температуре $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 10 mM в присутствии 100 ед./мл Nystatin.

Анализ микроизображений с помощью программы «CytoDynamics». Для реализации компьютерной флуориметрии применяли специализированный программный пакет «CytoDynamics» (госрегистрация № 2016612766). Для цифровой обработки берутся файлы, получаемые непосредственно с камеры. «CytoDynamics» определяет контуры групп и индивидуальных клеток – области интереса (ОИ) – на начальном кадре серии и удерживает контур изображения на последующих во времени снимках (рис. 2) [18].

На изображении каждой ОИ программа определяет периметр, площадь и интегральную интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна внутриклеточной концентрации натрия [19]. Соответствие интенсивности флуоресценции и $[\text{Na}^+]_i$ определяли в каждой экспериментальной группе.

Статистический анализ. Усреднённые профили флуоресценции строили по средним значениям точек индивидуальных профилей ОИ. На графиках усреднённых профилей точки представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Количество профилей, усредняемых в каждой точке экспериментального профиля в группе с соответствующим временем консервации, указано в разделе. Средние величины, полученные таким образом, рассматривали как независимые. Размер выборки (n) для определения статистических достоверностей различия $[\text{Na}^+]_i$ определялся количеством точек на плато в периоде II и был равен 9 ($n = 9$). Достоверности различий определяли с применением t -критерия Стьюдента для двух независимых групп. Соответствие полученных значений флуоресценции нормальному распределению определяли с помощью теста Shapiro–Wilk (Statistica 6.1, statsoft.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальный профиль флуоресценции Sodium Green имеет три характерных квазистационарных участка, которые соответствуют внутриклеточной концентрации натрия в этих участках (рис. 3). В интервалах I и III внутриклеточная концентрация натрия соответствует его концентрации в среде. В интервале I энергозависимый транспорт остановлен, поскольку при температуре $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ активность Na/K АТФазы подавлена, и в клетках устанавливается $[\text{Na}^+]_i$, равновесная со средой ($147,4\text{ mM}$). В интервале III равновесие со средой устанавливается в результате повышения проницаемости плазматиче-

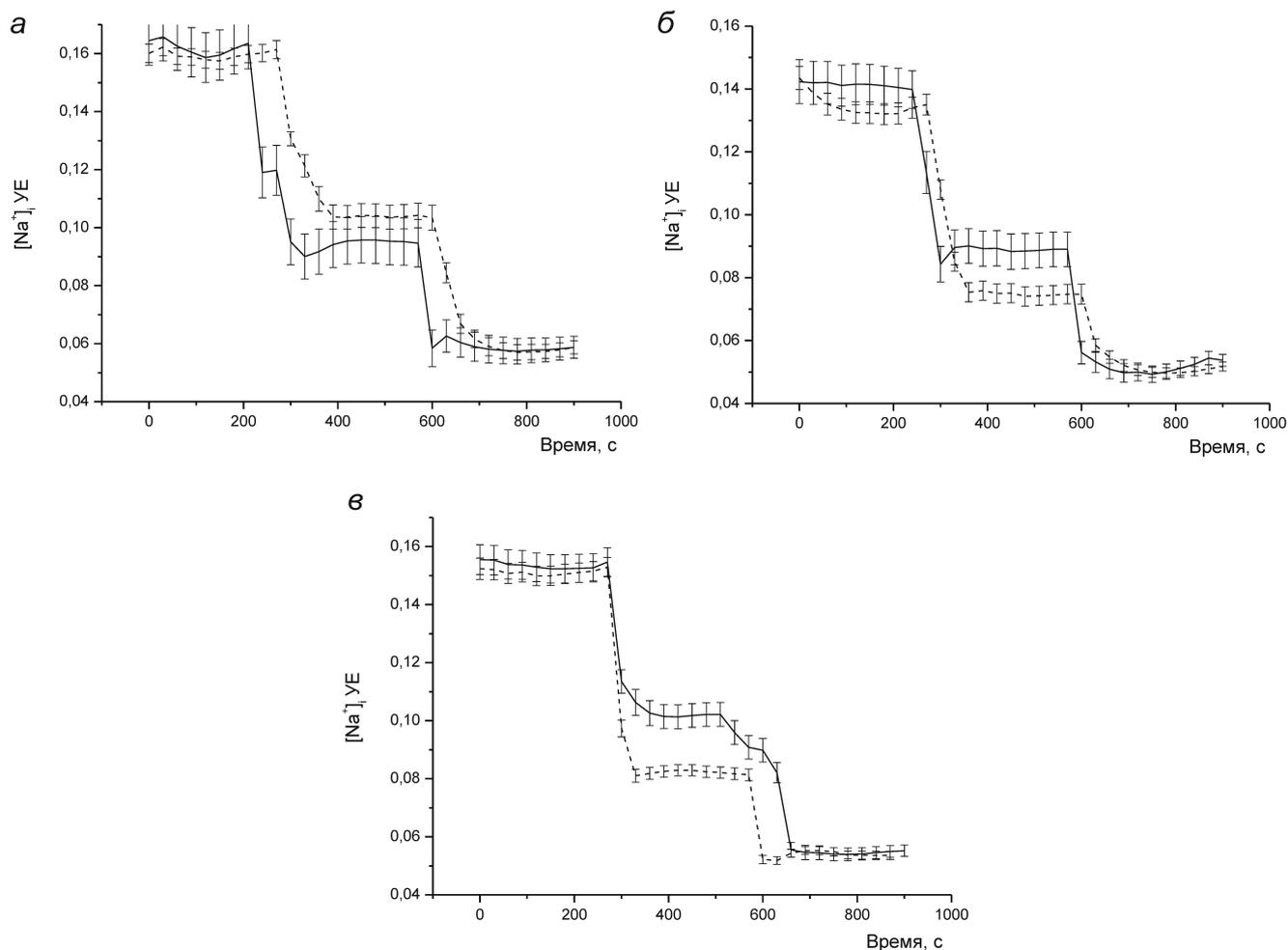


Рис. 3. Усреднённые профили интенсивности флуоресценции Sodium Green (условные единицы – YE). Влияние присутствия 1 нМ SkQ1 в среде консервации. *а* – 1 день (количество индивидуальных профилей ОИ: контроль – 110; эксперимент – 90), *б* – 5 дней (количество индивидуальных профилей ОИ: контроль – 100; эксперимент – 70), *в* – 10 дней (количество индивидуальных профилей ОИ: контроль – 70; эксперимент – 60). Сплошная линия – профиль препаратов, инкубированных в среде Eusol-C; пунктирная линия – профиль препаратов, инкубированных в среде Eusol-C, содержащей 1 нМ SkQ1

ческой мембраны, вызванной присутствием Nystatin. Интенсивность флуоресценции в интервале II соответствует величинам равновесной внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке в результате баланса потоков ионов натрия в клетку и из клетки. Таким образом, величина $[Na^+]_i$ определяется активностью Na/K АТФазы и скоростью входа, которая зависит от проницаемости плазматической мембраны (интервал II). В клетках эндотелия, подвергавшихся гипотермическому воздействию в консервационной среде EusolC, при 37 °С устанавливалась равновесная концентрация внутриклеточного натрия в зависимости от времени консервации и присутствия в консервационной среде 1 нМ SkQ1: 1 день – $27,3 \pm 1,9$ и $44,2 \pm 3,1$; 5 дней – $63,2 \pm 4,8$ и $47,3 \pm 3,2$; 10 дней – $69,2 \pm 4,7$ и $44,1 \pm 3,5$ (контрольная и

экспериментальная (1 нМ SkQ1) группы соответственно) ($p < 0,01$, $n = 9$). Присутствие в консервационной среде 1 нМ SkQ1 обусловило пониженный по сравнению с контролем стационарный уровень $[Na^+]_i$ в клетках эндотелия при температуре 37 °С.

Клетки эндотелия роговицы формируют клеточный монослой, важной функцией которого является регуляция осмотического баланса стромы роговицы. В настоящее время принято описание функции эндотелия посредством так называемой «rimp-leak» модели [7, 8], которая разделяет потоки активного и осмотического переноса. Нарушение целостности клеточного монослоя эндотелия приводит к резкому возрастанию парацеллюлярных потоков, описываемых как «утечка», что вызывает отёк и снижение прозрачности роговицы. Клетки эндотелия

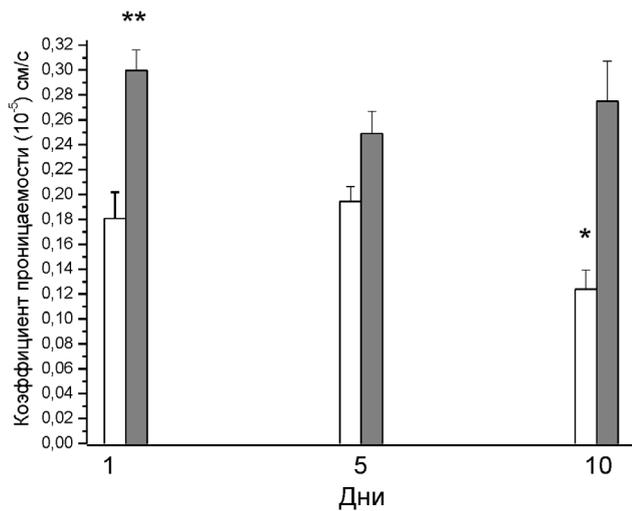


Рис. 4. Влияние гипотермической консервации на проницаемость плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы для ионов натрия. Неокрашенные столбцы – контроль; серые столбцы – присутствие 1 нМ SkQ1 в среде консервации. * Снижение проницаемости в контрольной группе ($p < 0,05$); ** превышение над контрольной группой ($p < 0,01$)

остановлены в фазе клеточного цикла G1, и по этой причине не проходят митотическое деление [20]. С возрастом часть клеток гибнет, и целостность клеточного слоя сохраняется за счёт оставшихся живых клеток, которые также формируют сплошной клеточный слой, но с меньшим количеством клеток [21, 22]. В этой связи до настоящего времени одним из основных критериев функциональности эндотелия и пригодности роговицы для трансплантации является морфологический критерий – плотность эндотелиальных клеток, которая снижается с возрастом донора [23]. Однако этот показатель не позволяет оценивать функциональные возможности эндотелия как регулятора осмотического баланса матрикса. Возможность определить транспортный потенциал клеток эндотелия может иметь значение как для определения пригодности ткани для трансплантации после периода консервации, так и в исследовательских целях для проверки эффективности создаваемых рецептур новых сред для консервации.

В настоящей работе проводили изучение влияния присутствия в среде консервации SkQ1 на восстановление баланса потоков натрия индивидуальных клеток эндотелия после окончания гипотермического хранения. Трансмембранный электрохимический градиент натрия создаётся Na/K-АТФазой и является значимым вторичным источником энергии для транспортных процессов в клетке. Таким образом, можно считать внутриклеточную концентрацию дан-

ного иона адекватным показателем функциональной возможности транспортного механизма клетки. Результаты исследования этого показателя в контрольных образцах позволяют говорить о значительном возрастании величины равновесной $[Na^+]_i$, устанавливающейся при 37 °С в клетках эндотелия по мере нарастания срока гипотермической консервации. Как показали результаты наших экспериментов, проницаемость плазматической мембраны клеток эндотелия для натрия после гипотермической консервации в течение 10 дней снижается в контрольных группах, но остаётся повышенной в группах с SkQ1 (рис. 4).

Это позволяет сделать вывод, что повышение в клетках равновесной $[Na^+]_i$ в контрольных группах связано со снижением транспортной функции Na/K-АТФазы. Присутствие в консервационной среде SkQ1 оказывает значительное и несколько неоднозначное влияние на равновесную $[Na^+]_i$, которая устанавливается при 37 °С в зависимости от длительности гипотермической консервации.

Как можно видеть из результатов экспериментов, препараты, хранившиеся в присутствии SkQ1, показывают близкие значения $[Na^+]_i$ во всех экспериментальных группах. И если для одного дня гипотермической консервации эти значения превышают показатели контрольной группы (рис. 3, а), что, по-видимому, связано с повышенной проницаемостью плазматической мембраны для натрия, то в экспериментальных группах 5 и 10 дней они значительно ниже значений в контрольных группах (рис. 3, б и в). Наиболее вероятным механизмом такого эффекта может быть протекторное действие SkQ1 на функции митохондрий и обеспечение энергией функции натрий-калиевого насоса. Как было показано в ряде работ по исследованию катионных производных пластохинона (SkQ, «Скулачев-ионов»), эти производные, обладающие высокой антиоксидантной активностью, являются возобновляемыми антиоксидантами [24, 25].

Заметный антиоксидантный эффект SkQ наблюдался уже при концентрации 1 нМ. Было показано, что соединения группы SkQ (в частности, SkQ1) способны проникать через плоские бислоиные мембраны, электрофоретически накапливаться в митохондриях с высокой избирательностью и восстанавливаться дыхательной цепью. В изолированных митохондриях в наномолярных концентрациях SkQ1 чрезвычайно эффективно снижает активность радикалов $OH\cdot$ [26]. Можно предположить, что при гипотермической консервации эффект SkQ1, обуславливающий высокую эффективность нат-

рий-калиевого насоса, объясняется высокой степенью восстановления энергетической функции митохондрий в клетках эндотелия. Производные пластохинона, включая SkQ1, в низких концентрациях способны блокировать развитие апоптоза, вызванного оксидативным стрессом: транслокацию проапоптозного белка bax в митохондрии и выход цитохрома *c* из митохондрий [26, 27]. Антиапоптозный эффект SkQ1, по-видимому, также может способствовать сохранению целостности клеточного монослоя и тем самым сохранению осморегулирующей функции эндотелия в процессе гипотермической консервации. Эффект SkQ1 на проницаемость клеток для ионов натрия, вероятно, вызван тем, что катионные производные пластохинона способны взаимодействовать с транспортерами плазматической мембраны и влиять на их функцию, но эти механизмы нуждаются в более глубоком исследовании.

Резюмируя результаты настоящей работы, можно сказать, что они дают основания для развития дальнейших исследований механизма действия SkQ1 на эндотелии роговицы и возможности применения этого агента в консервационных средах.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 19-08-00874 и 20-015-00147-а) и бюджетного финансирования по государственному заданию (проект № 0259-2021-0016).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maghsoudlou, P., Sood, G., and Akhondi, H. (2020) Cornea transplantation, in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
2. Bourne, W. M. (1998) Clinical estimation of corneal endothelial pump function, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **96**, 229-239.
3. Riley, M. V., Winkler, B. S., and Starnes, C. A. (1998) Regulation of corneal endothelial barrier function by adenosine, cyclic AMP, and protein kinases, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 2076.
4. Bonanno, J. A. (2012) Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump, *Exp. Eye Res.*, **95**, 2-7, doi: 10.1016/j.exer.2011.06.004.
5. Schmedt, T., Silva, M. M., Ziaei, A., and Jurkunas, U. (2012) Molecular bases of corneal endothelial dystrophies, *Exp. Eye Res.*, **95**, 24-34, doi: 10.1016/j.exer.2011.08.002.
6. Kuang, K., Li, Y., Yiming, M., Sánchez, J. M., Iserovich, P., et al. (2004) Intracellular $[Na^+]$, Na^+ pathways, and fluid transport in cultured bovine corneal endothelial cells, *Exp. Eye Res.*, **79**, 93-103, doi: 10.1016/j.exer.2004.02.014.
7. Riley, M., Winkler, B., Czajkowski, C., and Peters, M. (1995) The roles of bicarbonate and CO_2 in transendothelial fluid movement and control of corneal thickness, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**, 103-112.
8. Bonanno, J. A. (2003) Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium, *Prog. Retin Eye Res.*, **22**, 69-94, doi: 10.1016/s1350-9462(02)00059-9.
9. Bonanno, J. A., Guan, Y., Jelamskii, S., and Kang, X. J. (1999) Apical and basolateral CO_2 - HCO_3^- permeability in cultured bovine corneal endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, **277**, C545-C553, doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.3.C545.
10. Baturina, G. S., Pal'chikova, I. G., Konev, A. A., Smirnov, E. S., Katkova, L. E., et al. (2018) Examining effects of hypothermic conservation on sodium level in corneal graft endothelial cells [in Russian], *Vavilovskiy Zhurnal Genetiki i Selektii*, **22**, 433-437, doi: 10.18699/VJ18.379.
11. Baturina, G. S., Katkova, L. E., Pal'chikova, I. G., Solenov, E. I., and Iskakov, I. A. (2019) New approaches to examining functional activity of endothelial cells in corneal preparations [in Russian], *Sovremennye Tekhnologii v Oftal'mologii*, **5**, 262-265, doi: 10.25276/2312-4911-2019-5-262-265.
12. Wei, Y., Troger, A., Spahiu, V., Spahiu, V., Perekhvatova, N., et al. (2019) The role of SKQ1 (Visomitin) in inflammation and wound healing of the ocular surface, *Ophthalmol. Ther.*, **8**, 63-73, doi: 10.1007/s40123-018-0158-2.
13. Brzheskiy, V. V., Efimova, E. L., Vorontsova, T. N., Alekseev, V. N., gusarevich, O. G., et al. (2015) Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of Visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome, *Adv. Ther.*, **32**, 1263-1279, doi: 10.1007/s12325-015-0273-6.
14. Silachev, D. N., Plotnikov, E. Y., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Balakireva, A. V., et al. (2018) Neuroprotective effects of mitochondria-targeted plastoquinone in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *Molecules*, **23**, 1871, doi: 10.3390/molecules23081871.
15. Solenov, E. I. (2008) Cell volume and sodium content in rat kidney collecting duct principal cells during hypotonic shock, *J. Biophys.*, **2008**, 420963, doi: 10.1155/2008/420963.
16. Ilyaskin, A. V., Karpov, D. I., Medvedev, D. A., Ershov, A. P., Baturina, G. S., et al. (2014) Quantitative estimation of transmembrane ion transport in rat renal collecting duct principal cells, *Gen. Physiol. Biophys.*, **33**, 13-28, doi: 10.4149/gpb_2013063.
17. Ilyackin, A. V., Batupina, G. C., Medvedev, D. A., Epshov, A. P., Colenov, E. I. (2011) Examining reaction of renal collecting duct main cells to hypotonic shock. Experiment and mathematical modeling [in Russian], *Biofizika*, **56**, 550-560, doi: 10.1134/S0006350911030092.
18. Palchikova, I. G., Smirnov, E. S., and Konev, A. A. (2017) Analyses of DNA image cytometry uncertainty caused by diffractive blurring, *Appl. Mech. Mater.*, **870**, 369-374, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.870.369.
19. Winslow, J. L., Cooper, R. L., and Atwood, H. L. (2002) Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the $K(d)$, $F(\min)$, $F(\max)$ formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium, *J. Neurosci. Methods.*, **118**, 163-175, doi: 10.1016/s0165-0270(02)00100-0.

20. Maycock, N. J., and Marshall, J. (2014) Genomics of corneal wound healing: a review of the literature, *Acta Ophthalmol.*, **92**, e170-e184, doi: 10.1111/aos.12227.
21. Edelhofer, H. F. (2000) The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery, *Cornea*, **19**, 263–273, doi: 10.1097/00003226-200005000-00002.
22. Joyce, N. C. (2003) Proliferative capacity of the corneal endothelium, *Prog. Retin. Eye Res.*, **22**, 359–389, doi: 10.1016/s1350-9462(02)00065-4.
23. Vianna, L. M., Li, H. D., Holiman, J. D., Stoeger, C., Belfort, R. Jr., and Jun, A. S. (2016) Characterization of cryopreserved primary human corneal endothelial cells cultured in human serum-supplemented media, *Arq. Bras. Oftalmol.*, **79**, 37–41, doi: 10.5935/0004-2749.20160011.
24. Ptushenko, V. V., Solovchenko, A. E., Bychkov, A. Y., Chivkunova, O. B., Golovin, A. V., et al. (2019) Cationic penetrating antioxidants switch off Mn cluster of photosystem II in situ, *Photosynth. Res.*, **142**, 229–240, doi: 10.1007/s11120-019-00657-2.
25. Rokitskaya, T. I., Murphy, M. P., Skulachev, V. P., and Antonenko, Y. N. (2016) Ubiquinol and plastoquinol triphenylphosphonium conjugates can carry electrons through phospholipid membranes, *Bioelectrochemistry*, **111**, 23–30, doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.04.009.
26. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., et al. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. I. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273–1287, doi: 10.1134/s0006297908120018.
27. Saretzki, G., Murphy, M. P., and von Zglinicki, T. (2003) MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress, *Aging Cell*, **2**, 141–143, doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00040.x.

MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT SkQ1 IMPROVES HYPOTHERMIC PRESERVATION OF CORNEA

**G. S. Baturina^{1,2}, L. E. Katkova¹, I. G. Palchikova^{2,3},
N. G. Kolosova¹, E. I. Solenov^{1,2,4*}, and I. A. Iskakov⁵**

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru*

² *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

³ *Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences 630058 Novosibirsk, Russia*

⁴ *Novosibirsk State Technical University, 630087 Novosibirsk, Russia*

⁵ *Fedorov NMRC MNTK “Eye Microsurgery”, 630096 Novosibirsk, Russia*

Diseases affecting the cornea are frequent cause of blindness worldwide and keratoplasty is important way for healing of heavy affected cornea. For successful grafting functional competence of cornea endothelial cells is crucial. It makes important improvement the mediums for hypothermic storage and methods for evaluation of functional competence of cornea. Transport of water and ions by cornea endothelium is important for viability and optic properties of cornea. The effect of SkQ1 on recovering sodium concentration in endothelial cells after hypothermic preservation of cornea was studied. For this purpose, the effect of SkQ1 on intracellular sodium concentration of pig corneal endothelium cells after hypothermic preservation at 4°C during 1, 5, and 10 days in standard Eusol-C solution was determined. Concentration of intracellular sodium in preparation of endothelial cells was assayed using fluorescent dye Sodium Green. The fluorescent images were analyzed with custom made computer program “CytoDynamics”. The estimation of sodium concentrations in pig corneal endothelium cells revealed a significant increase in the level of intracellular sodium in control samples after 10 days of hypothermic preservation. Preservation in the presence of 1.0 nM SkQ1 led to set up a lower level of the equilibrium concentration of intracellular sodium in comparison with the control at the temperature 37°C. Statistically significant decrease of plasma membrane sodium permeability of endothelial cells after 10 days of hypothermic preservation in control samples was shown. No decrease in permeability was observed in samples subjected to preservation in the presence of 1 nM SkQ1. The presence of SkQ1 increases the ability of endothelial cells to restore the concentration of intracellular sodium. SkQ1 is a promising agent that helps to preserve the functional competence of endothelial cells during cold preservation.

Keywords: corneal endothelium, hypothermic preservation, SkQ1, intracellular sodium

УДК 577.12

СВОБОДНЫЕ S1-СУБЪЕДИНИЦЫ БЕЛКА ШИПОВ ВИРУСА SARS-CoV-2 МОГУТ ДЕЙСТВОВАТЬ В КАЧЕСТВЕ ФАКТОРА ПАТОГЕНЕЗА COVID-19

© 2021 А.В. Летаров^{1,2*}, В.В. Бабенко³, Е.Е. Куликов¹

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
117312 Москва, Россия; электронная почта: letarov@gmail.com

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

³ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.11.2020

После доработки 04.12.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Ранее было высказано предположение, что в патогенезе заболевания COVID-19 важную роль может играть дисбаланс ренин-ангиотензиновой системы. На мышинной модели было показано, что экспрессия белка-рецептора ACE2 на клеточной поверхности подавляется в ответ на инфекцию SARS-CoV, и такой же эффект может быть вызван экспозицией клеток к рекомбинантному вирусному белку шипов S. В случае естественной инфекции циркуляция S-белка в растворимой форме маловероятна, однако у вируса SARS-CoV-2 при созревании вириона большая часть тримеров S-белка подвергается препроцессингу протеазой фурином с расщеплением исходного полипептида по сайту на границе субъединиц S1 и S2. В результате при переходе белка шипов в конформацию слияния субъединицы S1, несущие рецептор-связывающие домены, могут свободно отделяться от связанных с мембраной субъединиц S2. Судьба S1-субъединиц, отщепившихся из-за спонтанного изменения конформации некоторых тримеров S-белка, экспонированных на вирионах и на внешней поверхности инфицированных клеток, никогда не исследовалась. Мы предполагаем, что свободные S1-субъединицы белка шипов SARS-CoV-2, выделяемые с поверхности инфицированных клеток и из вирионов *in vivo*, могут связываться с рецептором ACE2 и снижать его представленность на поверхности клетки. Снижение активности ACE2 на фоне постоянной или повышенной активности ACE в легких может приводить к преобладанию эффектов ангиотензина II, ведущих к усилению тромбоза, воспаления и повреждению легочной ткани. Этот механизм также предполагает связь между пониженной (по сравнению с формой D614G дикого типа) продукцией субъединиц S1 клетками при инфекции вирусом, несущим мутацию S-белка D614G, и отсутствием повышенной тяжести протекания COVID-19 при заражении этой линией вируса, несмотря на показанные для неё повышенную инфекционность и более высокую вирусную нагрузку *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, ренин-ангиотензиновая система, отщепление субъединицы S1 белка S, патогенез COVID-19, мутация D614G.

DOI: 10.31857/S0320972521030131

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19, которая уже привела примерно к двум миллионам смертей во всем мире, вызвана коронавирусом SARS-CoV-2, который, скорее всего, перешел к человеку от какого-то вида животных в конце 2019 года [1]. Вирус SARS-CoV-2 имеет большую степень сходства с Coronavirus RaTG13 летучих мышей,

однако высказывались предположения об участии промежуточного хозяина (вероятно, панголина) [2]. Считается, что адаптация вируса SARS-CoV-2 к репликации в клетках человека в основном была связана с приобретением новой последовательности рецептор-связывающего домена (RBD) белка шипов S. RBD вируса SARS-CoV-2 эффективно распознает находящийся на клеточной мембране ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) человека. Хотя родственный SARS-CoV-2, коронавирус SARS-CoV, также распознает ACE2 в качестве клеточного рецептора [1], только 8 из 14 критических для узнавания аминокислотных остатков

Принятые сокращения: ACE – ангиотензин-превращающий фермент; RBD – рецептор-связывающий домен; PAC – ренин-ангиотензиновая система.

* Адресат для корреспонденции.

оказываются консервативными между RBD этих вирусов [2].

Для проникновения коронавируса в клетку хозяина необходим процессинг вирусного S-белка протеазами хозяина, расщепляющими полипептидную цепь на стыке субъединиц S1 и S2 [1]. Этот процессинг может происходить непосредственно после присоединения вириона к клеточной поверхности за счет протеазы TMPRSS2 или уже в лизосомном компартменте после интернализации вируса [1, 3]. Протеолитический процессинг белка S позволяет субъединице S1 диссоциировать, запуская перестройку субъединицы S2 в конформацию, необходимую для инициации слияния вирусной и лизосомной мембран [4].

У некоторых коронавирусов протеолитический процессинг S-белка может происходить во время сборки вириона в аппарате Гольджи. Такой процессинг требует, чтобы на стыке субъединиц S1 и S2 присутствовал сайт узнавания протеазы фурина [3]. В SARS-CoV-2 вставка последовательности аминокислот PRRA после 675 а.о. S-белка создала сайт расщепления фурином – RRAR [2]. Наличие этого сайта приводит к эффективному процессингу S-белка в инфицированной клетке [3, 5]. Предварительный протеолитический процессинг S-белка перед высвобождением вируса делает последующую инфекцию более эффективной [3] и потенциально может позволить части вирусных частиц проникать в инфицируемые клетки непосредственно через плазматическую мембрану, не попадая в лизосомный компартмент [6]. Более эффективное проникновение SARS-CoV-2 в клетку, равно как и более высокое сродство его RBD к рецепторам (по сравнению с RBD SARS-CoV, в котором также отсутствует сайт процессинга фурином), может компенсировать для SARS-CoV-2 относительное снижение доступности RBD для связывания с рецептором ACE2, связанное с тем, что на большинстве тримеров S-белка SARS-CoV-2 два из трех RBD находятся в «закрытой» конформации [3]. В этой конформации RBD закрыты как для факторов гуморального иммунитета хозяина (например, антител), так и для распознавания рецепторов. У вируса SARS-CoV на большинстве шипов все три RBD присутствуют в «открытой» конформации [7].

Как и в случае любой вирусной пневмонии, патогенез заболевания COVID-19, а также SARS, как полагают, в основном связан с поражением вирусом эпителиальных клеток легких, а также, и даже в большей степени, с явлениями, связанными с ответом иммунной системы на инфекцию [1, 8].

ФОРМУЛИРОВКА ГИПОТЕЗЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установление роли белка ACE2 в качестве рецептора как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2 породило предположение о том, что помимо вышеупомянутых механизмов (которые могут быть дополнительно усилены вторичной бактериальной инфекцией), патогенез заболеваний COVID-19 и SARS может в значительной степени быть связан с вызванным вирусом дисбалансом ренин-ангиотензиновой системы (РАС) [9, 10].

ACE2 – это металлопротеаза клеточной поверхности (карбоксипептидаза), которая превращает декапептид ангиотензина I в нонапептид – ангиотензин (1–9). В отличие от ACE2, фермент ACE1 (или ACE) превращает ангиотензин I в физиологически активный октапептид ангиотензин II (или ангиотензин (1–8)). Ангиотензин (1–9), производимый ACE2, может быть далее преобразован в гептапептид ангиотензин (1–7) с помощью фермента ACE1. Ангиотензин II, в свою очередь, также может превращаться в ангиотензин (1–7) с помощью ACE2 [9, 10]. Нормальная физиологическая активность ангиотензина II способствует повышению артериального давления за счет вазоконстрикции, но в то же время этот гормон способствует развитию местных воспалительных реакций, повышению свертываемости крови, тромбозу, фиброзу, увеличению проницаемости капилляров и возникновению отеков. Ангиотензин (1–7) имеет в основном противоположные эффекты, снижая воспаление, тромбоз, фиброз и вызывая расширение сосудов [9, 10]. Следовательно, повышение представленности функционального белка ACE1 и/или понижение представленности функционального белка ACE2 на поверхности клеток приводят к усилению вызванного вирусной инфекцией повреждения легочной ткани.

В экспериментах на мышинной модели было показано, что инфекция SARS-CoV действительно снижает представленность белка ACE2 на поверхности клеток [9–11]. Было высказано предположение, что прикрепление вируса к молекулам ACE2 вызывает их удаление с поверхности клетки посредством ко-эндоцитоза с вирусом, снижая интегральную активность ACE2. Этот эффект предположительно приводит к дисбалансу между ангиотензином II и ангиотензином (1–7) в легочной ткани, что увеличивает тромбоз и степень повреждения легких [9, 10].

С нашей точки зрения, прямое механическое удаление молекул ACE2 путем прикрепления к ним вирионов вряд ли способно внести существенный вклад в общую активность фер-

мента в ткани легких. Для достижения такого эффекта потребовалось бы одновременное прикрепление вируса к значительной части клеток, продуцирующих ACE2 (таких, например, как альвеоциты II). Мы считаем, что при такой высокой вирусной нагрузке прямое повреждение эпителиальных клеток не было бы совместимо с выживаемостью пациента. В то же время наблюдаемая смертность даже в тяжелых случаях COVID-19 является весьма умеренной [1, 8]. Насколько нам известно, о случаях COVID-19 с выявленной экстремальной вирусной нагрузкой также пока не сообщалось.

В то же время в вышеупомянутом исследовании [11] снижение уровня ACE2 у мышей вызывалось не только экспериментальной инфекцией SARS-CoV, но и рекомбинантным белком шипа SARS-CoV. Мыши, предварительно обработанные этим белком (путем внутрибрюшинной инъекции), не обнаруживали значительных патологических изменений, однако при экспериментальном впрыскивании в легкие кислоты предварительная обработка животных рекомбинантным белком приводила к усилению повреждения легких [11].

Таким образом, белок шипов, который синтезируется в значительном молярном избытке по сравнению с вирусными частицами, может опосредовать подавление представленности функционального белка ACE2 на клеточной поверхности и вызвать таким образом дисбаланс PAC. Было показано, что S-белки мышинных коронавирусов и вируса SARS-CoV доставляются на поверхность клетки, предположительно, как побочный продукт процесса сборки и высвобождения вируса. Эти молекулы могут вызывать некоторые физиологические эффекты, такие как микропиноцитоз и/или слияние мембран соседних клеток [6], однако S-белок всегда остается прикрепленным к инфицированной клеточной мембране. Следует отметить, что значительное число копий белка S также присутствуют и на поверхности вирусных частиц, высвобождаемых инфицированными клетками в среду.

Недавно с помощью прямой криоэлектронной и просвечивающей электронной микроскопии [12] было продемонстрировано, что большинство тримеров S-белка на поверхности культивируемых *in vitro* частиц SARS-CoV-2 присутствует в конформации, характерной для фазы после слияния мембран. Другими словами, диссоциация субъединиц S1 и изменение конформации белка происходили до фактического связывания белком рецептора. Несмотря на то что в условиях исследования диссоциация субъединиц S1 могла частично происходить

из-за физико-химических воздействий во время градиентного центрифугирования, используемого для очистки вируса, или при инактивации вируса 0,05% β -пропиолактоном [12], этот результат демонстрирует, что в процессированных фурином вирионах SARS-CoV-2 диссоциация субъединицы S1 может быть вызвана относительно мягкими воздействиями или даже происходить спонтанно. Также было показано отщепление субъединиц S1 от частиц жизнеспособных лентивирусов, псевдотипированных белком шипа SARS-CoV-2 [13], что подтверждает возможность спонтанного «срабатывания» S-белка.

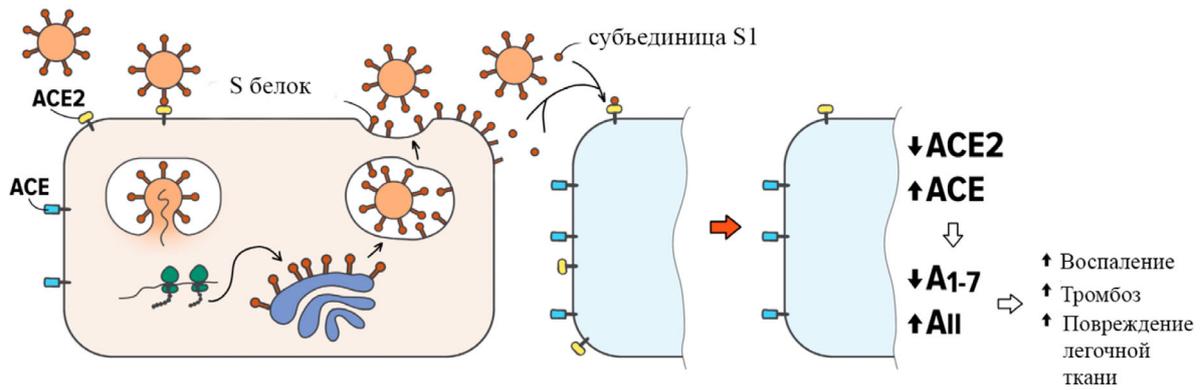
Мы предполагаем, что значительное количество свободных растворимых субъединиц S1 может таким образом высвобождаться с поверхности инфицированных клеток и вирионов (рисунков).

Эти молекулы несут интактные домены RBD, и их связывание с рецептором ACE2 может вызывать снижение активности ACE2 и последующие вредные для организма эффекты, как и предполагалось ранее [9, 14].

Если наша гипотеза окажется верной, высвобождение свободных S1-субъединиц из инфицированных клеток и вирионов должно снижать инфекционность вируса по отношению к клеткам, соседствующим с уже инфицированными вирусом клетками, уменьшая количество доступных для связывания с вирионами молекул рецептора ACE2 на их поверхности. Таким образом, можно прогнозировать две стадии развития инфекции SARS-CoV-2 в легких.

I. Вирус инфицирует определенные локусы ткани, где выработка свободного белка S1 вызывает подавление ACE2 в неинфицированных клетках, находящихся в непосредственной близости от инфицированных клеток. Одновременно экспрессия ACE2 на более удаленных клетках, которые еще не столкнулись с частицами S1, может быть увеличена за счет действия интерферона [15], активно продуцируемого инфицированными клетками. Локальный дисбаланс уровней ангиотензина II/ангиотензина (1–7) также может вызывать компенсаторное увеличение уровня ACE2 в клетках, не затронутых вирусом (хотя такая компенсаторная схема еще не описана, логично предположить, что она может существовать). Следовательно, распространение вируса на большие расстояния (например, в другие альвеолы) будет облегчено. В то же время степень повреждения тканей, вызванная вирусной инфекцией, будет ограничена.

II. Когда инфицировано большее количество лёгочной ткани, в единицу времени вырабатывается большее количество свободных S1-субъединиц, и за счёт их влияния возникает



Гипотеза об участии свободных субъединиц S1 белка шипов SARS-CoV-2 в патогенезе COVID-19. Спонтанное «срабатывание» тримеров S-белка, присутствующих на поверхности вирионов и инфицированных клеток, высвобождает свободные S1-субъединицы, содержащие RBD. Связывание этих частиц с рецепторами ACE2 на поверхности незараженных клеток может вызвать снижение представленности ACE2 и привести к дисбалансу ренин-ангиотензиновой системы. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

дисбаланс РАС на уровне органа или организма. Это вызывает вредные эффекты, такие как усиление воспаления, тромбоза и повреждения легких, как предполагалось ранее [9, 14]. Одновременно продукция вируса тканями должна снижаться из-за подавления экспрессии белка ACE2 в инфицированных областях легких.

Эта модель хорошо соответствует известным клиническим признакам COVID-19 [16, 17]: сообщалось о патологическом процессе, который обычно затрагивает большие участки легких с частой двусторонней пневмонией (стадия I нашей модели). При этом пациенты нередко чувствуют себя относительно хорошо, несмотря на то что, по данным рентгенологического исследования, вирусом поражена значительная часть легких; за этим может последовать резкое ухудшение состояния пациента через несколько часов или дней (поздняя стадия I и стадия II).

Предлагаемая нами модель позволяет предсказать, что ранее предложенные клинические вмешательства, направленные на поддержание баланса РАС [18], будут иметь синергический эффект с ингибиторами протеаз, особенно с ингибиторами фурина. Хотя данные исследований *in vitro* показывают, что отсутствие предварительного процессинга фурином белка S SARS-CoV-2 может быть компенсировано после присоединения вируса процессингом другими протеазами [3], наша модель предполагает, что ингибирование фурина не только уменьшит общую инфекционность вируса, но и сократит количество диссоциирующих от вирионов и инфицированных клеток частиц S1, в целом смягчая опосредованное дисбалансом РАС повреждение ткани.

Варианты SARS-CoV-2, содержащие мутацию D614G в белке S, которые были обнаруже-

ны недавно [13, 19–22], за короткое время стали эпидемиологически доминировать во многих регионах мира, где было отмечено их присутствие. Было продемонстрировано, что мутация D614G снижает стабильность тримера белка S, а также способствует переходу RBD в открытую конформацию [23]. Эта мутация увеличивает общую инфекционность и приспособленность вируса [19–22, 24], повышая сродство фурина к S-белку [25] и усиление репликации вируса [26]. Однако нет никаких указаний на то, что мутация D614G связана с более серьезными симптомами заболевания COVID-19. Интересно, что, несмотря на дестабилизацию тримера S-белка, несущего замену D614G, было показано, что высвобождение S1-частиц лентивирусами, псевдотипированными мутантным белком шипов SARS-CoV-2 [13], значительно снижено по сравнению с белком D614 дикого типа. Наша гипотеза предполагает, что уменьшение выделения растворимых субъединиц S1 может быть одним из факторов, ограничивающих заболеваемость и смертность при инфекциях SARS-CoV-2 D614G, несмотря на возросшую инфекционность вируса и более высокие уровни вирусной нагрузки, наблюдаемые при инфекциях SARS-CoV-2 мутантного генотипа [20].

Эксперименты, которые могут позволить проверить нашу гипотезу о S1-опосредованном патогенетическом процессе при COVID-19, относительно просты. Они могут быть основаны на количественных измерениях концентрации частиц S1 в культурах клеток, инфицированных SARS-CoV-2, получении препаратов частиц S1 путем ультрафильтрации супернатантов клеточных культур, экспериментальном тестировании способности таких частиц связываться с рецеп-

тором ACE2, а также на оценке влияния этих частиц на экспрессию ACE2 и параметры PAC как в культурах клеток, так и в моделях на животных.

Также следует отметить, что свободные молекулы S1 могут представлять собой потенциальную мишень для терапии или профилактики COVID-19. После отделения субъединицы S1 от S2 потенциальные эпитопы, свободные от гликанов, экранирующих в норме внешнюю поверхность полного S-белка [27], становятся экспонированными. Таким образом, иммунизация рекомбинантными белками, способными вызвать появление антител к этим консервативным эпитопам, становящимся доступными для связывания антител, может привести к секвестри-

рованию свободных молекул S1 в иммунные комплексы и их последующему устранению, что снизит вероятность тяжелого течения вирусной пневмонии, вызванной COVID-19.

Благодарности. Авторы благодарны Ксении Сайфулиной из Московского государственного психолого-педагогического университета за помощь в создании рисунка.

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

- Chen, Y., Liu, Q., and Guo, D. (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis, *J. Med. Virol.*, **92**, 418-423, doi: 10.1002/jmv.25681.
- Zhang, T., Wu, Q., and Zhang, Z. (2020) Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak, *Curr. Biol.*, **30**, 1578, doi: 10.1016/j.cub.2020.03.063.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., and Li, F. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727-11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
- Walls, A. C., Tortorici, M. A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch, B. J., Rey, F. A., and Veesler, D. (2017) Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11157-11162, doi: 10.1073/pnas.1708727114.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., and Pöhlmann, S. (2020) A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells, *Mol. Cell*, **78**, 779-784, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
- Freeman, M. C., Peek, C. T., Becker, M. M., Smith, E. C., and Denison, M. R. (2014) Coronaviruses induce entry-independent, continuous macropinocytosis, *mBio*, **5**, doi: 10.1128/mBio.01340-14.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263.
- Matricardi, P. M., Dal Negro, R. W., and Nisini, R. (2020) The first, holistic immunological model of COVID-19: Implications for prevention, diagnosis, and public health measures, *Pediatr. Allergy Immunol.*, **31**, 454-470, doi: 10.1111/pai.13271.
- Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J. C., et al. (2020) Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2, *Circ. Res.*, **126**, 1456-1474, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317015.
- Verdecchia, P., Cavallini, C., Spanevello, A., and Angeli, F. (2020) The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection, *Eur. J. Int. Med.*, **76**, 14-20, doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., et al. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury, *Nat. Med.*, **11**, 875-879, doi: 10.1038/nm1267.
- Liu, C., Mendonça, L., Yang, Y., Gao, Y., Shen, C., et al. (2020) The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by cryo-EM and cryo-ET, *Structure*, **28**, 1218-1224, e1214.
- Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Rangarajan, E. S., Izzard, T., Farzan, M., and Choe, H. J. B. (2020) The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.06.12.148726.
- Verdecchia, P., Cavallini, C., Spanevello, A., and Angeli, F. (2020) The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection, *Eur. J. Int. Med.*, **76**, 14-20, doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.
- Ziegler, C. G. K., Allon, S. J., Nyquist, S. K., Mbanjo, I. M., Miao, V. N., et al. (2020) SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues, *Cell*, **181**, 1016-1035, e19, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
- Siordia, J. A., Jr. (2020) Epidemiology and clinical features of COVID-19: a review of current literature, *J. Clin. Virol.*, **127**, 104357, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104357.
- Zhao, D., Yao, F., Wang, L., Zheng, L., Gao, Y., Ye, J., Guo, F., Zhao, H., and Gao, R. (2020) A comparative study on the clinical features of COVID-19 pneumonia to other pneumonias, *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 756-761, doi: 10.1093/cid/ciaa247.
- Sriram, K., and Insel, P. A. (2020) A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance, *Br. J. Pharmacol.*, **177**, 4825-4844, doi: 10.1111/bph.15082.
- Groves, D. C., Rowland-Jones, S. L., and Angyal, A. (2020) The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.109.
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., et al. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus, *Cell*, **182**, 812-827, e819, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.

21. Long, S. W., Olsen, R. J., Christensen, P. A., Bernard, D. W., Davis, J. J., et al. (2020) Molecular architecture of early dissemination and massive second wave of the SARS-CoV-2 virus in a major metropolitan area, *mBio*, **11**, doi: 10.1128/mBio.02707-20.
22. Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., et al. (2020) Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness, *Nature*, doi: 10.1038/s41586-020-2895-3.
23. Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T. P., et al. (2020) Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant, *Cell*, **183**, 739-751.e8, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.032.
24. Ogawa, J., Zhu, W., Tonnu, N., Singer, O., Hunter, T., Ryan, A. L., and Pao, G. M. (2020) The D614G mutation in the SARS-CoV2 Spike protein increases infectivity in an ACE2 receptor dependent manner, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.21.214932.
25. Mohammad, A., Alshawaf, E., Marafie, S. K., Abu-Farha, M., Abubaker, J., and Al-Mulla, F. (2020) Higher binding affinity of Furin to SARS-CoV-2 spike (S) protein D614G could be associated with higher SARS-CoV-2 infectivity, *Int. J. Infect. Dis.*, doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.033.
26. Hou, Y. J., Chiba, S., Halfmann, P., Ehre, C., Kuroda, M., et al. (2020) SARS-CoV-2 D614G variant exhibits enhanced replication *ex vivo* and earlier transmission *in vivo*, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.09.28.317685.
27. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., and Crispin, M. (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike, *Science*, **369**, 330-333, doi: 10.1126/science.abb9983.

FREE SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN S1 PARTICLES MAY ACT AS A FACTOR OF COVID-19 PATHOGENESIS

Hypothesis

A. V. Letarov^{1,2*}, V. V. Babenko³, and E. E. Kulikov¹

¹ *Winogradsky Institute of Microbiology, RC Biotechnology RAS, 117312 Moscow, Russia; E-mail: letarov@gmail.com*

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

³ *Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine,
Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia*

The imbalance of the renin-angiotensin system is currently considered as a potentially important factor of the pathogenesis of COVID-19 disease. It has been shown previously in the murine model, that the expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) on the cell surface is downregulated in response to the infection by SARS-CoV virus or recombinant spike protein (S protein) alone. In the case of natural infection, circulation of the S protein in a soluble form is unlikely. However, in SARS-CoV-2, a large fraction of S protein trimers is pre-processed during virion morphogenesis due to the presence of furin protease cleavage site between the S1 and S2 subunits. Therefore, S protein transition into the fusion conformation may be accompanied by the separation of the S1 subunits carrying the receptor-binding domains from the membrane-bound S2 subunits. The fate of the S1 particles shed due to the spontaneous “firing” of some S protein trimers exposed on the virions and on the surface of infected cells has been never investigated. We hypothesize that the soluble S1 subunits of the SARS-CoV-2 S protein shed from the infected cells and from the virions *in vivo* may bind to the ACE2 and downregulate cell surface expression of this protein. The decrease in the ACE2 activity on the background of constant or increased ACE activity in the lungs may lead to the prevalence of angiotensin II effects over those of angiotensin (1-7), thus promoting thrombosis, inflammation, and pulmonary damage. This hypothesis also suggests the association between less pronounced shedding of the S1 particles reported for the S protein carrying the D614G mutation (vs. the wild type D614 protein), and lack of increased severity of the COVID-19 infection caused by the mutant (D614G) SARS-CoV-2 strain, despite its higher infectivity and higher *in vivo* viral load.

Keywords: SARS-CoV-2, renin-angiotensin system, Spike protein S1 subunit shedding, COVID-19 pathogenesis, D614G mutation