

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 12

Декабрь 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 12, 2023

Феноптоз (специальный выпуск)

Приглашённый редактор Р.А. Зиновкин

От редакции	2357
Изменения в системе глутамат/ГАМК в гиппокампе крыс с возрастом и при развитии признаков болезни Альцгеймера <i>А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова, Д.В. Телегина</i>	2358
Характеристика новой линии мышей с мутацией в гене <i>NFE2L2 (NRF2)</i> <i>Е.С. Егоров, Н.Д. Кондратенко, О.А. Аверина, О.А. Пермяков, М.А. Емельянова, А.С. Приходько, Л.А. Зиновкина, П.В. Сергиев, Р.А. Зиновкин</i>	2375
Роль митохондриальной ДНК в репликативном старении дрожжей (обзор) <i>А.В. Азбарова, Д.А. Кнорре</i>	2387

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Серотониновые рецепторы – потенциальная мишень для лечения болезни Альцгеймера (обзор) <i>Д.В. Еремин, Е.М. Кондаурова, А.Я. Родный, К.А. Молобекова, Д.А. Кудлай, В.С. Науменко</i>	2399
Роль убиквитин-протеасомной системы в биологии стволовых клеток (обзор) <i>А.В. Буров, А.А. Родин, В.Л. Карпов, А.В. Морозов</i>	2422
Роль киназы <i>Aurora B</i> в нормальных и опухолевых клетках (обзор) <i>Е.В. Титова, Г.С. Шагиева, В.Б. Дугина, П.Б. Копнин</i>	2435
Топология полиубиквитиновых цепей в хроматосомном окружении убиквитин-лигазы E3 RNF168 <i>А.А. Кудряева, Л.А. Якубова, Г.А. Саратов, В.И. Владимиров, В.М. Липкин, А.А. Белогуров</i>	2446
Влияние состава липидной матрицы на активность мембранотропных ферментов галактонолактонооксидазы из <i>Trypanosoma cruzi</i> и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из <i>Arabidopsis thaliana</i> в системе обращённых мицелл <i>А.А. Чудин, Е.В. Кудряшова</i>	2457
Низкочастотные колебания олигомеров бактериохлорофилла в хлоросомах фотосинтезирующих зелёных бактерий <i>А.Г. Яковлев, А.С. Таисова, З.Г. Фетисова</i>	2469
Действие дексаметазона на адгезию нейтрофилов человека и сопутствующую секрецию <i>С.И. Галкина, Е.А. Голенкина, Н.В. Федорова, А.Л. Ксенофонтов, М.В. Серебрякова, В.И. Стадничук, Л.А. Баратова, Г.Ф. Судьбина</i>	2481

- Противоположное влияние гомологов CRABP1 и CRABP2 на пролиферацию клеток рака молочной железы и их чувствительность к ретиноевой кислоте
А.Д. Еникеев, П.М. Абрамов, Д.С. Елкин, А.В. Комельков, А.А. Беляева, Д.М. Силантьева, Е.М. Чевкина 2496
- Дикарбонил-модифицированные липопротеиды низкой плотности – ключевые индукторы экспрессии генов *LOX-1* и *NOX1* в культивируемых эндотелиоцитах пупочной вены человека
В.З. Ланкин, М.Г. Шаронов, А.К. Тихазе, Р.Г. Гончаров, О.А. Антонова, Г.Г. Коновалова, В.И. Новоселов 2517
- Ноцистатин и продукты его протеолиза как двойные модуляторы кислото-чувствительных ионных каналов 3-го типа (ASIC3), обладающие болевым и обезболивающим эффектом
Д.И. Осмаков, Н.В. Тарасова, А.А. Недорубов, В.А. Паликов, Ю.А. Паликова, И.А. Дьяченко, Я.А. Андреев, С.А. Козлов 2531
- Изменения в структуре вириона А-вируса картофеля при ограниченном протеолизе *in situ* по данным тритиевого мечения и компьютерного моделирования
А.Л. Ксенофонтов, Л.А. Баратова, П.И. Семенюк, Н.В. Федорова, Г.А. Бадун 2541

CONTENTS

Vol. 88, Issue 12, 2023

Phenoptosis (Special Issue)

Guest Editor R. A. Zinovkin

Editorial	2357
Changes in the Glutamate/GABA System in the Hippocampus of Rats with Age and during the Alzheimer's Disease Signs Development <i>A. O. Burnyasheva, N. A. Stefanova, N. G. Kolosova, and D. V. Telegina</i>	2358
A New Mouse Strain with Mutation in the <i>NFE2L2 (NRF2)</i> Gene <i>E. S. Egorov, N. D. Kondratenko, O. A. Averina, O. A. Permyakov, M. A. Emelyanova, A. S. Prikhodko, L. A. Zinovkina, P. V. Sergiev, and R. A. Zinovkin</i>	2375
Role of Mitochondrial DNA in Yeast Replicative Aging (Review) <i>A. V. Azbarova and D. A. Knorre</i>	2387

REGULAR ARTICLES

Serotonin Receptors – A Potential Target for the Treatment of Alzheimer's Disease (Review) <i>D. V. Eremin, E. M. Kondaurova, A. Ya. Rodny, K. A. Molobekova, D. A. Kudlay, and V. S. Naumenko</i>	2399
Role of Ubiquitin-Proteasome System in Stem Cell Biology (Review) <i>A. V. Burov, A. A. Rodin, V. L. Karpov, and A. V. Morozov</i>	2422
The Role of <i>Aurora B</i> Kinase in Normal and Cancer Cells (Review) <i>E. Titova, G. Shagieva, V. Dugina, and P. Kopnin</i>	2435
Topology of Ubiquitin Chains in the E3 Ubiquitin Ligase RNF168 Chromatosome Entourage <i>A. A. Kudriaeva, L. A. Yakubova, G. A. Saratov, V. I. Vladimirov, V. M. Lipkin, and A. A. Belogurov, Jr.</i>	2446
Impact of Lipid Matrix Composition on the Activity of Membranotropic Enzymes Galactonolactone Oxidase from <i>Trypanosoma cruzi</i> and L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase from <i>Arabidopsis thaliana</i> in the System of Reverse Micelles <i>A. A. Chudin and E. V. Kudryashova</i>	2457
Low-Frequency Vibrations of Bacteriochlorophyll Oligomers in Chlorosomes of Photosynthetic Green Bacteria <i>A. G. Yakovlev, A. S. Taisova, and Z. G. Fetisova</i>	2469
Effect of Dexamethasone on Human Neutrophil Adhesion and Concomitant Secretion <i>S. I. Galkina, E. A. Golenkina, N. V. Fedorova, A. L. Ksenofontov, M. V. Serebryakova, V. I. Stadnichuk, L. A. Baratova, and G. F. Sud'ina</i>	2481

- Opposing Effects of CRABP1 and CRABP2 Homologs on the Proliferation of Breast Cancer Cells and Their Sensitivity to Retinoic Acid
A. D. Enikeev, P. M. Abramov, D. S. Elkin, A. V. Komelkov, A. A. Belyaeva, D. M. Sylantieva, and E. M. Tchevkina 2496
- Dicarbonyl-Modified Low-Density Lipoproteins Are Key Inducers of *LOX-1* and *NOX1* Gene Expression in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells
V. Z. Lankin, M. G. Sharapov, A. K. Tihaze, R. G. Goncharov, O. A. Antonova, G. G. Konovalova, and V. I. Novoselov 2517
- Nocistatin and Products of Its Proteolysis as Dual Modulators of Type 3 Acid-Sensing Ion Channels (ASIC3) with an Algesic and Analgesic Effect
D. I. Osmakov, N. V. Tarasova, A. A. Nedorubov, V. A. Palikov, Y. A. Palikova, I. A. Dyachenko, Y. A. Andreev, and S. A. Kozlov 2531
- Changes in the Structure of Potato Virus A Virions during Limited Proteolysis *in situ* According to Tritium Labeling Data and Computer Simulation
A. L. Ksenofontov, L. A. Baratova, P. I. Semenyuk, N. V. Fedorova, and G. A. Badun 2541

ОТ РЕДАКЦИИ

DOI: 10.31857/S0320972523120011, EDN: NJFFDV

Академик Владимир Петрович Скулачёв – один из наиболее известных и уважаемых российских учёных, он внёс огромный вклад в современную биоэнергетику и биохимию. Одним из его последних научных достижений стала концепция фенотоза, предложенная им в 1999 году [1]. Эта гипотеза стала продолжением идей Августа Вейсмана, который выдвинул идею запрограммированной смерти организма как механизма, возникшего путём естественного отбора, для исключения старых особей в целях освобождения жизненного пространства и ресурсов молодым поколениям [2]. Под фенотозом В.П. Скулачёв понимал «гибель организма, запрограммированную в его геноме». При этом концепция фенотоза напрямую не противопоставляется объяснению феномена старения в результате накопления мутаций, а дополняет её. Это позволяет иметь «оптимистичный взгляд» на перспективы увеличения продолжительности активной жизни за счёт выключения сигналов, вызывающих старение [3]. В.П. Скулачёв также рассматривал возможность существования программ быстрого, или острого фенотоза, запускающих гибель организма, например, при тяжёлых инфекционных заболеваниях [3].

Концепция фенотоза привела к многочисленным теоретическим исследованиям в этой области и способствовала появлению новых интересных направлений в геронтологии. Начиная с 2012 г. журнал «Биохимия» [«Biochemistry» (Moscow)] ежегодно публикует специальные выпуски, посвящённые фенотозу. К сожалению, в этом году Владимир Петрович Скулачёв трагически погиб, но это не явилось препятствием к продолжению этой традиции.

В данном выпуске опубликованы экспериментальные и теоретические работы, которые с разных сторон рассматривают проблемы фенотоза, старения, а также иных феноменов, связанных с этими процессами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачёв В. П. (1999) Фенотоз: запрограммированная смерть организма, *Биохимия*, **64**, 1679-1688.
2. Weismann, A. (1884) *Leben und Tod*, Verlag von Gustav Fisher, Jena, Germany, 85 pp.
3. Скулачёв В. П. (2012) Что такое «фенотоз» и как с ним бороться? *Биохимия*, **77**, 827-846.

Р.А. Зиновкин

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЛУТАМАТ/ГАМК В ГИППОКАМПЕ КРЫС С ВОЗРАСТОМ И ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2023 А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова*, Д.В. Телегина

*Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: kolosova@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 30.08.2023

После доработки 12.10.2023

Принята к публикации 17.10.2023

Глутамат и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) являются наиболее распространенными нейромедиаторами в ЦНС и играют ключевую роль в синаптической стабильности/пластичности. Оптимальный гомеостаз глутамата и ГАМК важен для здорового старения и снижения риска неврологических заболеваний, в то время как долговременный дисбаланс может способствовать развитию нейродегенеративных расстройств, включая болезнь Альцгеймера (БА). Его нормализация рассматривается как перспективная стратегия профилактики и/или лечения БА, однако сведения об изменениях ГАМКергической и глутаматергической систем в мозге с возрастом, а тем более – в динамике развития БА, ограничены. Не ясно, является ли дисбаланс возбуждающих/тормозных систем причиной или следствием развития заболевания. В настоящем исследовании проанализированы изменения с возрастом уровня глутамата и ГАМК, ферментов их синтеза и деградации (глутаминазы, глутаминсинтазы, GABA-T и GAD67), а также их транспортеров (GLAST, GLT-1 и GAT1) и субъединиц рецепторов (GluA1, NMDAR1, NMDA2B и GABAAR1) в гиппокампе крыс Вистар и преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых спонтанно развиваются все ключевые признаки БА, что позволяет рассматривать их как модель наиболее распространенной (> 95%) спорадической формы заболевания. Результаты исследования свидетельствуют о том, что с возрастом активность системы глутамат/ГАМК снижается в гиппокампе крыс обеих линий. В то же время у крыс OXYS не выявлено существенных изменений этой системы, связанных с развитием характерных для БА нейродегенеративных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, болезнь Альцгеймера, глутамат, ГАМК, гиппокамп, крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972523120023, EDN: NNTTTG

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, болезнь Альцгеймера (БА) становится основной причиной сенильной деменции, заболеваемость которой растет на фоне увеличения продолжительности жизни и старения населения развитых и развивающихся стран [1]. БА проявляется выраженным снижением когнитивных способностей на фоне накопления в мозге токсических форм пептида бета-амилоида (β -амилоида), образования амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, синаптической недостаточности и ги-

бели нейронов [2–4]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе развития БА, не ясны; эффективных подходов, способных замедлить или остановить прогрессию заболевания, нет. Предполагается, что изменения с возрастом баланса нейромедиаторных систем – возбуждающей глутаматергической и тормозной ГАМКергической в головном мозге – могут быть предпосылкой развития БА и вносить существенный вклад в ее прогрессию [5]. Глутамат и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) контролируют многие процессы в ЦНС, в том числе – общий уровень возбуждения головного мозга. Так, избыточное возбуждение тор-

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; GABAAR1 – субъединица 1 рецептора GABA-A; GABA-T – ГАМК-трансаминаза; GAD – декарбоксилаза глутаминовой кислоты (глутаматдекарбоксилаза); GAD67 – изоформа глутаматдекарбоксилазы; GAT1 – ГАМК-транспортер тип 1; GLAST – глиальный транспортер глутамата и аспартата; GLT-1 – глиальный транспортер глутамата 1; GluA1 – субъединица 1 рецептора AMPA; NMDAR1 – субъединица 1 рецептора NMDA; NMDAR2B – субъединица 2B рецептора NMDA.

* Адресат для корреспонденции.

мозной ГАМКергической системы подавляет, а избыточная активность возбуждающей глутаматергической системы вызывает эксайтотоксичность. Сбалансированное взаимодействие этих двух нейротрансмиттерных систем необходимо для физиологического гомеостаза, тогда как длительный дисбаланс может способствовать развитию психических и нейродегенеративных расстройств, в том числе – БА [6]. Предотвращение возбуждающе-тормозного дисбаланса активно обсуждается как многообещающая стратегия профилактики и/или лечения БА [7], при этом сведения об изменениях ГАМКергической и глутаматергической систем с возрастом, а тем более на различных стадиях развития БА, крайне ограничены. Остается неясным, является ли дисбаланс возбуждающих/тормозных систем причиной или следствием развития БА. Связано это, прежде всего, с невозможностью исследовать ранние доклинические стадии заболевания у людей и с дефицитом адекватных моделей заболевания.

Целью настоящего исследования явилась оценка вклада изменений с возрастом баланса глутаматергической и ГАМКергической систем в развитие и прогрессию наиболее распространенной (>95% случаев) спорадической формы БА. Работа выполнена на преждевременно стареющих крысах OXYS – уникальной модели спорадической формы заболевания. У этих животных при отсутствии характерных для наследственной БА мутаций в генах *Psen1*, *App* и *Psen2* спонтанно развиваются все ключевые признаки заболевания [8–10]. Уже в возрасте 3–5 мес. у крыс OXYS выявляются нарушения поведения и снижение когнитивных функций, гиперфосфорилирование тау-белка, нарушение длительной посттетанической потенциации, синаптическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, которые прогрессируют на фоне повышения уровня белка-предшественника амилоида (APP), усиленного накопления β -амилоида и образования амилоидных бляшек в мозге к возрасту 12 мес. и достигают ярко выраженных стадий БА-подобной патологии к 16–18 мес. [10, 11]. Ранее мы исследовали изменения с возрастом системы глутамат/ГАМК в сетчатке крыс OXYS и оценили их возможный вклад в развитие характерной для крыс ретинопатии [12]. Целью настоящей работы явилось сравнение изменений с возрастом системы глутамат/ГАМК в гиппокампе крыс Вистар (контроль) и OXYS на разных стадиях развития признаков БА, включая доклиническую. Для этого мы исследовали в гиппокампе уровень глутамата и ГАМК,

а также содержание ключевых ферментов, регулирующих цикл глутамат/ГАМК: глутаминазы, которая катализирует образование глутамата из глутамината; глутаминсинтетазы, катализирующей синтез глутамината из глутамата; глутаматдекарбоксилазы (GAD67), превращающей глутамат в ГАМК, и фермента деградации ГАМК – ГАМК-трансаминазы (GABA-T). Кроме того, мы исследовали уровень рецепторов глутамата и ГАМК – субъединицы 1 рецептора NMDA (NMDAR1) и субъединицы 2B рецептора (NMDAR2B), субъединицы 1 рецептора AMPA (GluA1) и субъединицы $\alpha 1$ рецептора GABA-A (GABAAR1), а также переносчиков глутамата – глиального транспортера глутамата и аспартата (GLAST, также известного как EAAT1), транспортера глутамата 1 (GLT-1, также известного как EAAT2) и транспортера ГАМК (GAT1). Наконец, мы сравнили у крыс OXYS и Вистар возрастные изменения уровня экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК в гиппокампе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Все проводимые исследования были выполнены на крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контроль). Животных содержали в стандартных условиях вивария при освещении 12 ч свет/12 ч темнота, они получали гранулированный корм и воду *ad libitum*.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Содержание глутамата и ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар в возрасте 1,5; 3; 12 и 18 мес. ($n = 5$ для каждой группы) оценивали иммуноферментным анализом (ИФА), используя наборы ELISA Kit for Glutamic Acid (Glu) CES122Ge и ELISA Kit for Gamma-Aminobutyric Acid (gABA) CEA900Ge, согласно протоколу производителя («Cloud-Clone Corp.», США). Наборы для ИФА были подобраны таким образом, чтобы детектировался только уровень свободных глутамата и ГАМК. Глутамат и ГАМК в составе белков (связанный глутамат и ГАМК соответственно) были исключены из анализа.

Концентрацию тотального белка определяли с помощью набора реактивов ThermoFisher Pierce™ BCA Protein Assay («ThermoFisher», США). Для определения концентрации строили калибровочную кривую, используя белок из набора производителя.

Вестерн-блот-анализ. Содержание ключевых ферментов синтеза ГАМК и глутамата –

глутаминазы, глутаминсинтетазы, глутаматдекарбоксилазы (GAD67) и ГАМК-трансаминазы (GABA-T), белков-транспортеров глутамата (GLAST и GLT-1) и ГАМК (GAT1), субъединиц рецепторов глутамата (NMDAR1, NMDAR2B, GluA1) и ГАМК (GABAAR1) определяли в гиппокампе методом вестерн-блот-анализа у крыс OXYS и Вистар в возрасте 1,5; 3; 12 и 18 мес. ($n = 6$ для каждой группы).

Крыс ингаляционно анестезировали CO_2 и декапитировали. Гиппокампы выделяли на льду и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при температуре -70°C до момента использования. Все стадии выделения белка проводили на льду при температуре 4°C . Образцы гиппокампов гомогенизировали с помощью лизирующего буфера RIPA (150 мМ NaCl; 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4); 1% Triton X-100; 0,1% додецилсульфата натрия (SDS); 1% дезоксихолата натрия (Deoxycholic Acid, Sodium Salt) и 1 мМ ЭДТА) с ингибиторами протеаз и фосфотаз (P8340 и P5726-5ML; «Sigma-Aldrich», США). После тщательной гомогенизации раствор белка центрифугировался на 12 000 g в течение 30 мин при 4°C . Супернатант хранили при температуре -20°C . Концентрацию тотального белка определяли с помощью набора реактивов ThermoFisher Pierce™ BCA Protein Assay («ThermoFisher»; #23225). Для определения концентрации строили калибровочную кривую, используя белок из набора производителя.

Образцы (по 50 мкг общего белка) в загрузочном буфере (10% SDS; 15% β -меркаптоэтанола; 50% глицерина; 0,3 М Tris-HCl (pH 6,8); бромфеноловый синий) наносили на дорожки 8%-ного полиакриламидного геля в буфере Tris-Glycine (1,5 М, pH 8,8), разделяли электрофорезом и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США), которую затем блокировали 5%-ным BSA в PBST (1 ч). Далее, мембраны инкубировали в течение 16 ч при температуре $+4^\circ\text{C}$ с первичными антителами (анти-глутаминаза, анти-глутаминсинтетазы, анти-NMDAR1, анти-субъединица 1 AMPA-рецептора (анти-GluA1), анти-GAD67, анти-GABA-T, анти- $\alpha 1$ рецептора GABA-A, анти-GLT-1 и анти-GAT1 (ab93434, ab64613, ab109182, ab183797, ab26116, ab152134, ab33299, ab41621 и ab426 соответственно; «Abcam», США; разведение — 1 : 1000) и анти-GLAST и анти-NMDA2B (PA519709 и 71-8600, «Invitrogen», США; разведение — 1 : 1000). В качестве референсного белка использовали β -актин (42 кДа; ab6276, «Abcam»; 1 : 5000) и GAPDH (37 кДа; ab8245, «Abcam»; 1 : 5000). После отмывок в PBST проводили инкуба-

цию со вторичными антителами анти-мышь и анти-кролик (ab150115 и ab96886 соответственно; «Abcam»; 1 : 5000) в течение 1 ч при комнатной температуре. Флуоресцентное излучение детектировали с помощью прибора ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»). Интенсивность свечения бендов измеряли с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Массовое параллельное секвенирование (RNA-Seq). Массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-Seq) образцов гиппокампов крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 5 и 18 мес. ($n = 3$ для каждой группы) проводили на платформе Illumina Genome Analyzer IIx в ОАО «Геноаналитика», Россия. Для каждого образца было получено ~40 млн ридов длиной 50 нуклеотидов. Риды картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* (версия Rnor_5.0.76) с помощью программы TopHat (v2.0.10). На основании данных RNA-Seq при уровне значимости $\text{adj} p < 0,05$ были сформированы списки дифференциально экспрессирующихся генов [13, 14].

Список генов глутаматергического сигнального пути был извлечен из базы данных генома крысы (RGD; 126 генов крысы; <https://rgd.mcg.edu/>). Список генов ГАМКергического синапса был получен в базе данных KEGG pathway (89 генов человека; <http://www.genome.jp/kegg/>).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA (версия 10.0). Использовали тест Колмогорова–Смирнова для проверки на нормальность распределений. В анализ включали все значения, лежащие в пределах трех среднеквадратических отклонений от выборочного среднего. Использовали дисперсионный анализ с последующим post-hoc-сравнением межгрупповых средних по критерию Ньюмена–Кейлса. Как независимые рассматривали факторы «генотип» и «возраст». Данные представлены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение ($M \pm SD$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка содержания глутамата и ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар разного возраста. На первом этапе работы был проведен иммуноферментный анализ (ELISA) содержания свободных глутамата и ГАМК в гиппокампе крыс Вистар и OXYS разного возраста. Мы не обнаружили межлинейных и возрастных

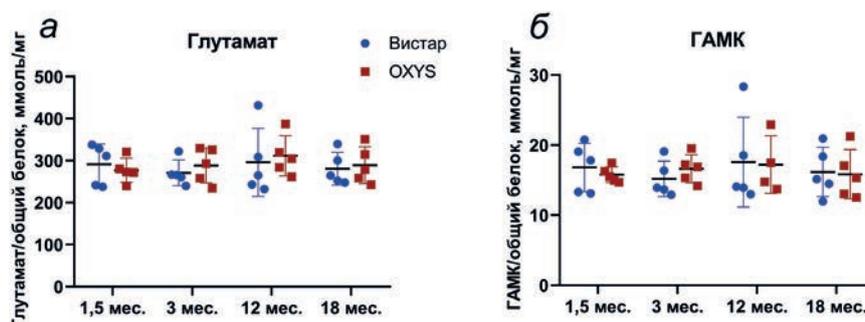


Рис. 1. Уровень глутамата (а) и ГАМК (б) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS разного возраста. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 5$)

различий в содержании глутамата (рис. 1, а) и ГАМК (рис. 1, б) в гиппокампе крыс обеих линий. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA не выявил влияния факторов «генотип» и «возраст». Таким образом, уровень исследованных нейромедиаторов оставался стабильным в гиппокампе крыс OXYS и Вистар на протяжении всей жизни.

Изменения глутаматергической системы в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. Оценивая изменения глутаматергической системы с возрастом в головном мозге крыс, мы анализировали экспрессию ключевых ферментов синтеза и деградации глутамата — белков глутаминазы и глутаминсинтетазы, а также белков-транспортёров GLAST, GLT-1 и субъединиц рецепторов глутамата NMDAR1, NMDAR2B и GluA1 (субъединицы рецептора AMPA). Глутамат не способен проникать через гематоэнцефалический барьер, соответственно, в головном мозге глутамат синтезируется *de novo* в астроцитах и нейронах из глутаминина с помощью фермента глутаминазы. В астроцитах глутамат под действием фермента глутаминсинтетазы превращается в глутамин [15].

Согласно двухфакторному дисперсионному анализу, уровень глутаминазы (рис. 2, а) и глутаминсинтетазы (рис. 2, б) не зависел от возраста, и на него не влиял генотип животных — мы не выявили различий в содержании этих белков в гиппокампе крыс OXYS и Вистар.

Важным фактором, определяющим доступность глутамата для сигнальных процессов, является система его обратного захвата и рециркуляции. Поглощение глутамата из синаптической щели необходимо для нормальной нейротрансмиссии в глутаматергических синапсах, поскольку высокий уровень внеклеточного глутамата может оказывать токсический эффект на нейроны и синапсы. Транспортёры GLAST и GLT-1 удаляют глутамат из внеклеточного пространства, что необ-

ходимо для поддержания низких нетоксичных концентраций этого нейромедиатора [16]. Согласно анализу ANOVA, уровни белков GLAST и GLT-1 в гиппокампе зависели от фактора «возраст» ($F_{3,37} = 10,2$; $p < 0,001$ и $F_{3,31} = 4,4$; $p < 0,01$ соответственно) и не зависели от фактора «генотип». Как показало сравнение групповых средних, уровень GLAST у крыс обеих линий повышался к возрасту 12 мес., а к возрасту 18 мес. — снижался до уровня 1,5-месячных животных (рис. 2, в). Уровень GLT-1 у крыс OXYS повышался с 3 до 12 мес. и оставался на том же уровне в возрасте 18 мес., в то время как у крыс Вистар уровень GLT-1 с возрастом значимо не изменялся (рис. 2, г). Межлинейных различий в содержании транспортёров GLAST и GLT-1 обнаружено не было.

Постсинаптическое окончание распознает глутамат с помощью глутаматных рецепторов [6]. Далее, мы проанализировали в гиппокампе крыс Вистар и OXYS разного возраста содержание субъединиц ионотропных рецепторов глутамата NMDA и AMPA-типа, ответственных за быструю нейротрансмиссию: субъединицу 1 AMPA-рецептора (также известную как GluA1) и субъединицы NR1 и NR2B NMDA-рецептора (NMDAR2B и NMDAR1; также известны как GluN2B и GluN1 соответственно). Согласно двухфакторному дисперсионному анализу, уровень белка NMDAR1 зависел только от фактора «возраст» ($F_{3,34} = 1,6$; $p < 0,05$). Сравнение групповых средних показало, что уровень NMDAR1 снижался с возрастом у крыс Вистар — к возрасту 12 мес. он стал достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с 1,5-месячными животными (рис. 2, д). У крыс OXYS достоверных изменений с возрастом не выявлено, поэтому уже в возрасте 12 мес. у них наблюдалась тенденция к повышению, по сравнению с крысами Вистар, содержания NMDAR1 ($p = 0,06$), а в возрасте 18 мес. у крыс OXYS уровень NMDAR1 был достоверно повышен ($p < 0,05$; рис. 2, д).

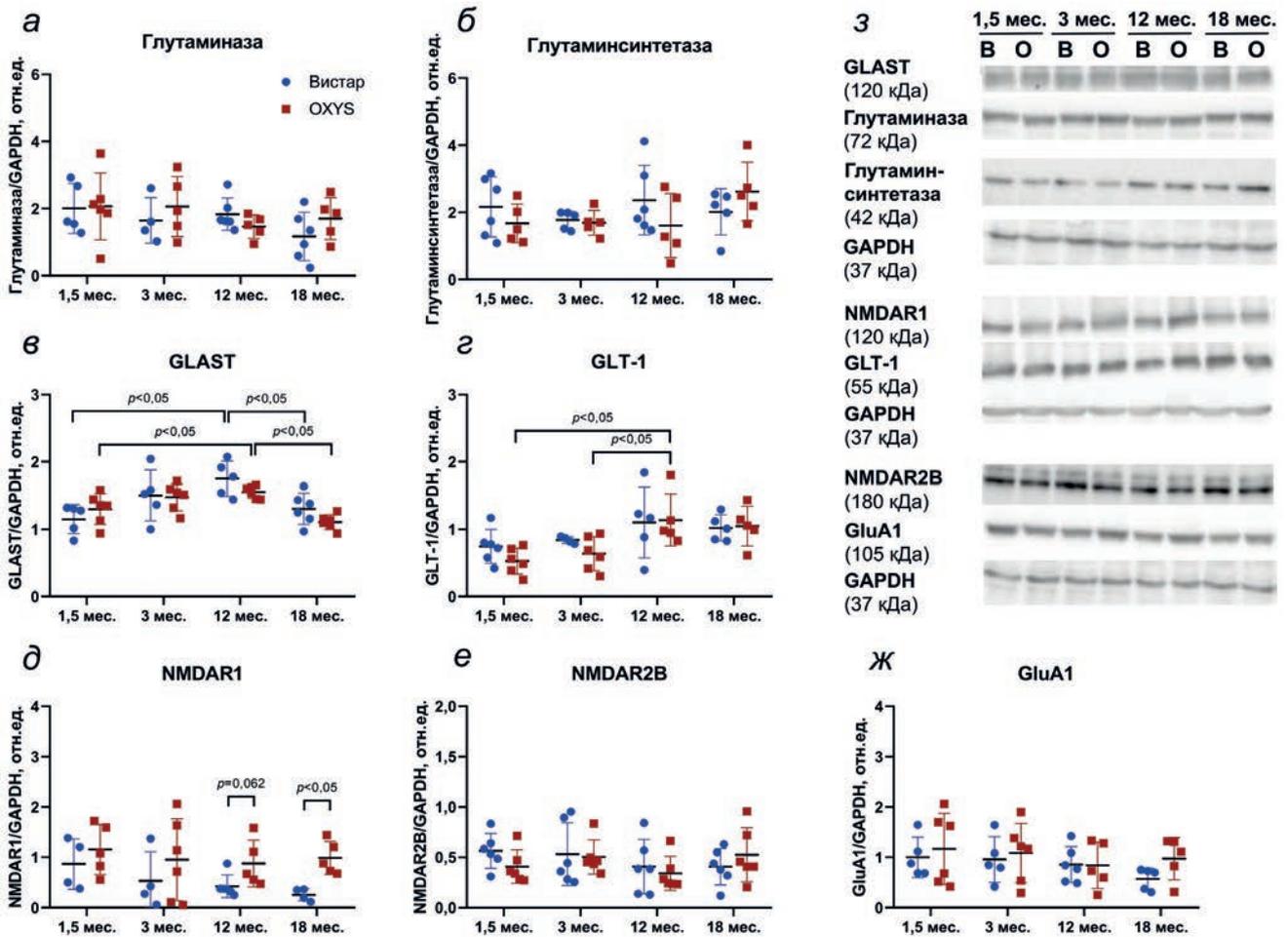


Рис. 2. Изменения уровня белка глутаминазы (а), глутаминсинтетазы (б), GLAST (в), GLT-1 (г), NMDAR1 (д), NMDAR2B (е), GluA1 (ж) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. з – Репрезентативные изображения белков, полученные методом вестерн-блот-анализа: В – Вистар, О – OXYS. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 4-6$)

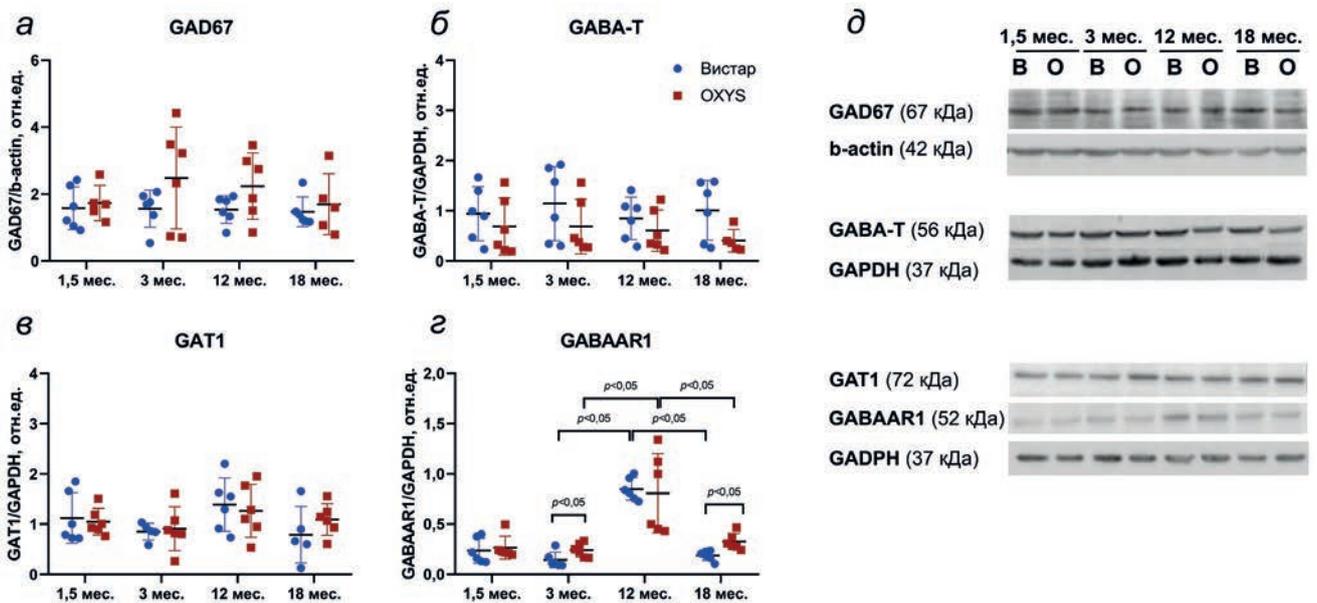


Рис. 3. Изменения уровня белков GAD67 (а), GABA-T (б), GAT1 (в) и GABAAR1 (г) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. д – Репрезентативные изображения белков, полученные методом вестерн-блот-анализа: В – Вистар, О – OXYS. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 4-6$)

Содержание NMDAR2B и GluA1 в гиппокампе крыс OXYS и Вистар не различалось и не менялось с возрастом (рис. 2, *e* и *ж*).

Изменения ГАМКергической системы в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. Далее, мы оценили экспрессию ключевых ферментов синтеза (глутаматдекарбоксилазы, GAD67) и деградации (ГАМК-трансаминазы, GABA-T) ГАМК. Как показал двухфакторный дисперсионный анализ, уровень GAD67 у крыс OXYS был повышен ($F_{1,38} = 4,2; p < 0,05$), а уровень GABA-T – снижен ($F_{1,39} = 6,3; p < 0,02$) по сравнению с крысами Вистар, при этом возраст на содержание этих белков не влиял (рис. 3, *a* и *b*). Не влиял возраст и на содержание GAT1 – транспортера, который удаляет ГАМК из синаптической щели. Различий в содержании белка GAT1 в гиппокампе крыс OXYS и Вистар также выявлено не было (рис. 3, *в*).

Содержание GABAAR1 зависело от возраста животных ($F_{3,40} = 39,7; p < 0,001$), но на него не влиял генотип. Уровень GABAAR1 значительно возрастал к возрасту 12 мес., а затем снижался к возрасту 18 мес. у крыс обеих линий ($p < 0,05$; рис. 3, *г*). При этом сравнение групповых средних показало, что в возрасте 3 и 18 мес. у крыс OXYS уровень GABAAR1 был выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$).

Изменения экспрессии связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК генов в гиппокампе крыс OXYS и Вистар с возрастом. Для оценки изменений экспрессии генов, связанных с глутаматергическими и ГАМКергическими синапсами у крыс OXYS, были проанализированы ранее полученные данные RNA-Seq гиппокампа 20-дневных, 5- и 18-месячных крыс OXYS и Вистар [13, 14]. У крыс OXYS с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 29 из 126 генов, связанных (согласно RGD) с глутаматергическим синапсом, а с возраста 5 до 18 мес. – 56 генов. У крыс Вистар с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 34 генов и с возраста 5 до 18 мес. – 51 гена. Из 88 генов, связанных (согласно базе данных KEGG pathway database) с ГАМКергическим синапсом, в гиппокампе крыс OXYS с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 13 генов и с 5 до 18 мес. – 41 гена, а у крыс Вистар с возраста 20 дней до 5 мес. – 21 гена, с 5 до 18 мес. – 37 генов. Следует отметить, что с 5 до 18 мес. в гиппокампе крыс обеих линий экспрессия подавляющего большинства генов, связанных с сигнальными путями глутамата/ГАМК, снижалась (таблица).

В возрасте 20 дней экспрессия только четырех генов, связанных с глутаматергическим

синапсом, в гиппокампе крыс OXYS отличалась от таковой у крыс Вистар: уровень мРНК *Grin3b*, *Grm6* и *Slc1a2* был повышен, а *Pla2g5* – снижен ($\text{padj} < 0,05$). В возрасте 5 мес. у крыс OXYS была изменена (повышена) экспрессия генов *Grin3b* и *Pla2g2d*; в 18 мес. – повышена экспрессия гена *Pla2g6*, а генов *Gng12*, *Grm6*, *Ppp3r1* и *Slc1a1* – снижена. Из числа генов, связанных с ГАМКергическим синапсом, только в возрасте 18 мес. мы идентифицировали дифференциально экспрессирующиеся гены, экспрессия которых была у крыс OXYS снижена: *Gad2*, *Gng12*, *Plcl1* и *Trak2*.

Таким образом, нам не удалось обнаружить существенных межлинейных различий в уровне экспрессии генов, связанных с глутаматергическими и ГАМКергическими синапсами. С возрастом в гиппокампе крыс обеих линий в основном происходят сходные изменения экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК, при этом уровень мРНК подавляющего большинства этих генов закономерно снижался как у крыс Вистар, так и у крыс OXYS.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение эффективности глутаматергической передачи сигналов с возрастом, выявляемое у разных видов животных, Cox et al. [5] рассматривают как одно из консервативных проявлений старения, подобное саркопении или остеопорозу. Закономерно, что снижение и нарушение синаптической пластичности ускоряется при преждевременном старении, в том числе – при БА. Основной целью настоящего исследования была оценка вклада изменений с возрастом глутаматергической и ГАМКергической систем в возникновение и прогрессию признаков БА в головном мозге крыс OXYS – модели спорадической формы заболевания. Неожиданно для нас, мы не обнаружили существенных различий в функционировании этих систем в гиппокампе крыс OXYS и контрольных крыс Вистар. Одна из возможных причин – снижение уровня общего белка, на который были нормированы уровни глутамата и ГАМК в этой работе. В другой работе при исследовании метаболома гиппокампа методом ЯМР-спектроскопии мы нормировали все показатели на вес образцов и выявили повышение уровня ГАМК с возраста 20 дней до 5 мес. и его снижение с 5 до 18 мес. у крыс обеих линий, а также аналогичные возрастные изменения уровня глутамата у крыс OXYS [17]. Такие результаты указывают на то,

Изменения с возрастом экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата/ГАМК, в гиппокампе крыс OXYS и Вистар

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
4-Аминобутират аминотрансфераза	<i>Abat</i>			↓	↓
Аденилатциклаза 1	<i>Adcy1</i>		↑	↓	↓
Аденилатциклаза 2	<i>Adcy2</i>		↑	↓	↓
Аденилатциклаза 4	<i>Adcy4</i>		↓		↑
Аденилатциклаза 5	<i>Adcy5</i>			↓	↓
Аденилатциклаза 6	<i>Adcy6</i>	↓	↓		
Аденилатциклаза 9	<i>Adcy9</i>	↑	↑	↓	↓
Потенциал-зависимая субъединица кальциевого канала N-типа альфа-1B	<i>Cacna1b</i>			↓	
Потенциал-зависимая субъединица кальциевого канала N-типа альфа-1C	<i>Cacna1c</i>			↓	↓
Кальциневрин-подобный EF-рука белок 1	<i>Chp1</i>			↓	↓
Скаффолд белок 4 диска MAGUK большие	<i>Dlg4</i>			↓	↓
DLG ассоциированный белок 1	<i>Dlgap1</i>	↑	↑	↓	↓
Белок типа 1, ассоциированный с рецептором ГАМК типа A	<i>Gabarapl1</i>		↑		
Белок типа 2, ассоциированный с рецептором ГАМК типа A	<i>Gabarapl2</i>			↑	↑
Субъединица 1 рецептора ГАМК типа B	<i>Gabbr1</i>			↑	
Субъединица 2 рецептора ГАМК типа B	<i>Gabbr2</i>			↓	↓
Субъединица альфа 1 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra1</i>			↓	↓
Субъединица альфа 2 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra2</i>			↓	↓
Субъединица альфа 3 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra3</i>			↓	↓
Субъединица альфа 5 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra5</i>			↓	↓
Субъединица бета 1 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrb1</i>	↑	↑	↓	↓
Субъединица бета 2 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrb2</i>			↓	↓
Субъединица бета 3 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrb3</i>			↓	↓
Субъединица дельта рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrd</i>	↑	↑	↑	
Субъединица гамма 2 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrg2</i>	↑		↓	↓
Субъединица гамма 3 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrg3</i>				↓

Таблица (продолжение)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
Субъединица тета рецептора ГАМК типа А	<i>Gabraq</i>				↓
Глутаматдекарбоксилаза 2	<i>Gad2</i>			↓	↓
Глутаминаза	<i>Gls</i>			↓	↓
Глутаминаза 2	<i>Gls2</i>		↑		
Субъединица альфа i1 G-белка	<i>Gnai1</i>			↓	↓
Субъединица альфа i3 G-белка	<i>Gnai3</i>		↓	↓	
Субъединица альфа o1 G-белка	<i>Gnao1</i>			↓	↓
Субъединица альфа q G-белка	<i>Gnaq</i>			↓	↓
Комплексный локус GNAS	<i>Gnas</i>			↑	↑
Субъединица G-белка бета 1	<i>Gnb1</i>			↓	↓
Субъединица G-белка бета 2	<i>Gnb2</i>			↑	
Субъединица G-белка бета 4	<i>Gnb4</i>	↓	↓	↓	↓
Субъединица G-белка бета 5	<i>Gnb5</i>		↑		
Субъединица G-белка гамма 12	<i>Gng12</i>	↓	↓	↓	↓
Субъединица G-белка гамма 2	<i>Gng2</i>	↓		↓	↓
Субъединица G-белка гамма 3	<i>Gng3</i>	↓		↑	
Субъединица G-белка гамма 4	<i>Gng4</i>	↓			↓
Субъединица G-белка гамма 5	<i>Gng5</i>			↑	↑
Субъединица G-белка гамма 8	<i>Gng8</i>				↑
Субъединица 1 глутаматного ионотропного рецептора типа AMPA	<i>Gria1</i>		↑	↓	↓
Субъединица 3 глутаматного ионотропного рецептора типа AMPA	<i>Gria3</i>			↓	
Субъединица 2 глутаматного ионотропного рецептора каинатного типа	<i>Grik2</i>			↓	
Субъединица 3 глутаматного ионотропного рецептора каинатного типа	<i>Grik3</i>			↓	↓
Субъединица 4 глутаматного ионотропного рецептора каинатного типа	<i>Grik4</i>			↑	
Субъединица 2A глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin2a</i>	↑	↑	↓	↓

Таблица (продолжение)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
Субъединица 2В глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin2b</i>	↑	↑		↓
Субъединица 2D глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin2d</i>				↓
Субъединица 3А глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin3a</i>			↓	↓
Субъединица 3В глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin3b</i>				↑
Глутаматный metabotropный рецептор 1	<i>Grm1</i>	↑	↑	↓	↓
Глутаматный metabotropный рецептор 2	<i>Grm2</i>		↓		
Глутаматный metabotropный рецептор 3	<i>Grm3</i>	↑	↑	↓	↓
Глутаматный metabotropный рецептор 4	<i>Grm4</i>	↓	↓		
Глутамат 5	<i>Grm5</i>			↓	↓
Глутаматный metabotropный рецептор 7	<i>Grm7</i>			↓	↓
Белок 1, связанный с хантингином	<i>Hap1</i>	↑	↑		
Скаффолд белок семейства Гомер 1	<i>Homer1</i>			↓	↓
Скаффолд белок семейства Гомер 2	<i>Homer2</i>			↓	↓
Скаффолд белок семейства Гомер 3	<i>Homer3</i>			↑	↑
Инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор типа 1	<i>Itp1</i>	↑	↑	↓	↓
Инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор типа 2	<i>Itp2</i>	↓	↓		
Член 3 подсемейства J калиевых каналов внутреннего выпрямления	<i>Kcni3</i>			↓	↓
Член 6 подсемейства J калиевых каналов внутреннего выпрямления	<i>Kcni6</i>			↓	
Митоген-активируемая протеинкиназа 1	<i>Mapk1</i>	↑	↑	↓	↓
Фактор, чувствительный к N-этилмалеимиду, сливающаяся с пузырьками АТРаза	<i>Nsf</i>		↑		
Фосфолипаза А2, группа IIС	<i>Pla2g2c</i>		↑		
Фосфолипаза А2, группа III	<i>Pla2g3</i>	↓	↓	↑	↑
Фосфолипаза А2, группа IVE	<i>Pla2g4e</i>	↓			
Фосфолипаза А2, группа V	<i>Pla2g5</i>	↓			
Фосфолипаза А2, группа VI	<i>Pla2g6</i>				↓

Таблица (продолжение)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
Фосфолипаза С бета 1	<i>Plcb1</i>	↑		↓	↓
Фосфолипаза С бета 4	<i>Plcb4</i>		↓	↓	
Фосфолипаза С подобная 1 (неактивная)	<i>Plcl1</i>			↓	
Фосфолипаза D1	<i>Pld1</i>	↓	↓	↓	↓
Фосфолипаза D2	<i>Pld2</i>	↓	↓		
Протеинфосфатаза 3, каталитическая альфа субъединица	<i>Ppp3ca</i>	↑		↓	
Протеинфосфатаза 3, каталитическая бета субъединица	<i>Ppp3cb</i>			↓	
Протеинфосфатаза 3, каталитическая гамма субъединица	<i>Ppp3cc</i>				↑
Протеинфосфатаза 3, регуляторная субъединица В, альфа	<i>Ppp3r1</i>		↑	↓	
сАМР-зависимая протеинкиназа, каталитическая бета субъединица	<i>Prkacb</i>			↓	↓
Протеинкиназа С альфа	<i>Prkca</i>			↓	↓
Протеинкиназа С бета	<i>Prkcb</i>			↓	↓
Протеинкиназа С гамма	<i>Prkcg</i>		↑	↓	
сАМР-зависимая протеинкиназа X-связанная каталитическая субъединица	<i>Prkx</i>		↓		
SH3 и множественные повторяющиеся домены анкирина 1	<i>Shank1</i>	↑			
Член 5 семейства 12 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc12a5</i>	↑	↑		
Член 6 семейства 17 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc17a6</i>	↓	↓	↓	↓
Член 8 семейства 17 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc17a8</i>		↓	↓	
Член 1 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a1</i>			↓	↓
Член 2 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a2</i>	↑	↑	↓	↓
Член 3 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a3</i>	↓			
Член 7 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a7</i>	↓	↓		

Таблица (окончание)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		ОХYS	Вистар	ОХYS	Вистар
Член 1 семейства 38 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc38a1</i>			↓	↓
Член 2 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc38a2</i>			↓	
Член 3 семейства 38 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc38a3</i>	↓	↓		
Член 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a1</i>				↓
Член 11 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a11</i>		↑	↓	↓
Член 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a12</i>		↓		
Член 13 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a13</i>		↓		
Моторный белок кинезин 2	<i>Trak2</i>			↓	↓
Член 1 подсемейства С канала с транзиторным рецепторным катионным потенциалом	<i>Trpc1</i>			↓	↓

Примечание. Стрелка вверх – гены, экспрессия которых повышалась с возрастом, стрелка вниз – гены, экспрессия которых снижалась с возрастом.

что в гиппокампе крыс обеих линий с возрастом происходят изменения баланса между системами глутамат/ГАМК. Следует отметить, что в литературе информация об изменениях при старении и развитии БА уровня глутамата, ферментов его синтеза и деградации противоречива. В ряде работ сообщается о снижении уровня глутамата в передней поясной извилине, гиппокампе и других областях мозга при старении [18–22]. Другие авторы утверждают, что в головном мозге крыс изменений синтеза глутамата и глутаминина не происходит и оборот глутамата не меняется с возрастом, что подтверждается данными об отсутствии изменений активности глутаминсинтетазы [23, 24].

Как показали результаты настоящего исследования, уровень ключевых ферментов синтеза (нейрональной глутамининазы) и деградации (глиальной глутаминсинтетазы) глутамата не меняются с возрастом и не различаются у крыс ОХYS и Вистар, что указывает на стабильность его синтеза в гиппокампе крыс на протяжении всей жизни. При этом следует отметить, что отсутствие изменений уровня глутамата нельзя однозначно рассматривать как показатель стабильности глутаматергической

системы при старении и при развитии признаков БА. Эكсайтотоксичность глутамата опосредована главным образом нарушением системы его обратного захвата, следствием которого и становится высокое содержание глутамата в синаптических щелях и, как следствие, гиперактивация NMDA-рецепторов [25].

Таким образом, важным фактором, определяющим доступность глутамата для процессов передачи сигнала, является система его обратного захвата и рециркуляции. Глутамат не может проникать через гематоэнцефалический барьер и вырабатывается в основном нейронами и астроцитами. Тем не менее сами нейроны не способны синтезировать глутамат из глюкозы через цикл трикарбоновых кислот из-за отсутствия в них фермента пируваткарбоксилазы [15]. В связи с этим важную роль играет образование глутамата в астроцитах, которое происходит двумя путями: путем синтеза *de novo* в цикле трикарбоновых кислот (на него приходится ~15% глутамата) или путем «рециркуляции» глутаминина из ГАМК и глутамата с помощью обратного захвата нейромедиаторов [6]. В физиологических условиях астроциты удаляют ~90% всего высвобождае-

мого ЦНС глутамата с помощью переносчиков возбуждающих аминокислот GLAST и GLT-1, которые необходимы для поддержания низких нетоксичных концентраций этого нейромедиатора [26]. Как показало наше исследование, как у крыс Вистар, так и у крыс OXYS содержание белка GLAST в гиппокампе увеличивалось к возрасту 12 мес. и уменьшалось к 18 мес. Нам не удалось обнаружить возрастных изменений уровня GLT-1 у крыс Вистар, тогда как у крыс OXYS он значительно повысился с возраста 3 до 12 мес., что может указывать на изменение обратного захвата глутамата. Вероятно, это связано с накоплением к 12 мес. токсичных форм β -амилоида в гиппокампе крыс OXYS [9]. Стоит отметить, что в гиппокампе пациентов с БА также были обнаружены незначительные изменения в количестве GLT-1: сообщается, что пространственный паттерн экспрессии этого транспортера изменен, и повышенное иммуноокрашивание GLT-1 наблюдается в отростках астроцитов и в нейропиле, особенно в зонах CA1 и CA3 гиппокампа, а также в зубчатой извилине [27].

Рецепторы NMDA и AMPA присутствуют примерно в 70% синапсов головного мозга млекопитающих, преимущественно в коре головного мозга, миндалине, полосатом теле и гиппокампе. Специфическое расположение этих рецепторов имеет большое значение, поскольку глутаматергическая система играет важную роль не только в нейропластичности, но и в эксайтотоксичности [28]. Было показано, что с возрастом глутаматергическая система, опосредуемая NMDA-рецепторами, становится гипофункциональной, и этот дефицит может приводить к когнитивной дисфункции как при нормальном старении, так и при патологических состояниях [5]. Кроме этого, есть доказательства того, что с возрастом происходит уменьшение количества NMDA-рецепторов на постсинаптических окончаниях нейронов в гиппокампе [29, 30], что значительно снижает биодоступность глутамата [31]. Известно, что NMDA-рецепторы представляют собой гетеротетрамеры, состоящие из двух обязательных субъединиц NMDAR1 и двух регуляторных субъединиц GluN2 (A–D) или GluN3 (A или B), расположенных в основном в дендритах нейронов. Поскольку гиппокамп является областью мозга, регулирующей когнитивные функции, регуляторные субъединицы в основном представлены NMDA2A или NMDA2B (GluN2A и GluN2B соответственно) [32].

В этой работе мы оценили возрастные изменения содержания облигатной субъединицы

NMDAR1 и субъединицы NMDA2B, опосредующей эксайтотоксические эффекты глутамата в гиппокампе крыс [33]. Уровень белка NMDAR2B значимо не изменялся с возрастом и не различался у крыс Вистар и OXYS, тогда как уровень субъединицы NMDAR1 уменьшался с возрастом в гиппокампе крыс Вистар, но значимо не менялся у крыс OXYS. В результате к 18 мес. содержание NMDAR1 становилось значительно выше у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар. Стоит отметить, что аналогичные изменения уровня белка NMDAR1 были обнаружены у пациентов с БА [34]. Возможно, что повышение NMDAR1 в гиппокампе при БА является компенсаторным механизмом, поскольку сообщалось, что увеличение количества субъединиц NMDAR1 и NMDA2A, но не NMDA2B, связано с консолидацией и формированием пространственной памяти [34].

В гиппокампе рецепторы AMPA, локализованные в основном в нейронах, являются компонентом большинства возбуждающих синапсов, особенно в области CA1 (~80% всех рецепторов). Наиболее изученной субъединицей рецептора AMPA является GluA1 [35]. Более того, нарушение синаптической пластичности, связанное с GluA1, рассматривается многими авторами как одно из ключевых событий на ранних стадиях развития БА [36]. Наш анализ уровня GluA1 не выявил его существенных изменений с возрастом и при развитии признаков БА у крыс OXYS. Возможно, это обусловлено тем, что мы оценивали его во всем гиппокампе, тогда как изменения экспрессии GluA1 могут иметь разную направленность в разных областях этой структуры мозга [34, 35].

Раньше считалось, что ГАМКергические нейроны более устойчивы к патологическим воздействиям β -амилоида по сравнению с холинергическими или глутаматергическими нейронами [36]. В последние годы была выдвинута гипотеза, согласно которой дисбаланс возбуждения/торможения может вызывать ГАМКергическую дисфункцию, повышающую уязвимость нейронов к воздействию неблагоприятных внешних факторов и патологическому стрессу, способствуя нарушению функциональных связей в мозге при развитии БА [37]. В настоящем исследовании мы не выявили различий в содержании ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар. Единственным прямым предшественником ГАМК в ЦНС является глутамат, из которого она преобразуется декарбоксилазой глутаминовой кислоты, или глутаматдекарбоксилазой (GAD).

В мозге млекопитающих GAD имеет две изоформы: GAD65 и GAD67 [38]. GAD65 преимущественно локализована на пресинаптических нервных окончаниях, в то время как GAD67 распределена по всей клетке. Следует отметить, что более 90% ГАМК в головном мозге синтезируется GAD67 [39, 40]. Мыши с нокаутом гена, кодирующего GAD67, умирают в течение недели после рождения, однако мыши с дефицитом экспрессии GAD67 жизнеспособны, хотя у них и отмечается аномальное поведение [41]. Напротив, мыши с нокаутом гена, кодирующего GAD65, выживают, но подвержены судорогам [42]. Дисфункция GAD67 связана с такими расстройствами головного мозга, как шизофрения [43], биполярное расстройство [44] и болезнь Паркинсона [45]. Сообщается, что экспрессия GAD67 не изменена в посмертных образцах ткани головного мозга пациентов с БА, но при этом остается не ясным, вовлечена ли GAD67 в прогрессию заболевания [46]. Также показано, что возраст и пол не влияют на экспрессию GAD67 в гиппокампе и коре мозга людей [47]. Согласно нашим данным, в гиппокампе крыс OXYS уровень GABA-T – фермента, ответственного за деградацию ГАМК в головном мозге и локализованного в основном в астроцитах – значительно ниже, в то время как уровень GAD67, которая катализирует образование ГАМК в нейронах, выше, чем у крыс Вистар. Эти результаты указывают на повышенный запрос на образование ГАМК в гиппокампе крыс OXYS. В то же время мы не выявили достоверных различий в содержании белка-переносчика ГАМК GAT1, который удаляет ГАМК из синаптической щели.

Ранее в экспериментах *in vitro* было показано, что нейротоксичность β -амилоида снижает активность ГАМКергических нейронов и ослабляет тормозные постсинаптические потенциалы путем подавления постсинаптических ГАМК-рецепторов [48, 49]. Однако в гиппокампе крыс OXYS уровень постсинаптического белка-рецептора ГАМК GABAAR1 в возрасте 3 мес. (в период манифестации признаков БА) и в период их активной прогрессии (12 мес.) был выше, чем у крыс Вистар. В гиппокампе уровень экспрессии GABAAR1 наиболее высок в зоне CA1, и, согласно ряду исследований, его экспрессия не изменяется с возрастом [50, 51]. Мы полагаем, что выявленное нами повышение экспрессии GABAAR1 в гиппокампе годовалых крыс OXYS может быть обусловлено нейродегенеративными изменениями, которые регистрируются у них уже в 3–5 мес. и с возрастом прогрессируют [52].

К возрасту 12 мес. в структурах мозга крыс OXYS происходит значительное накопление β -амилоида [9], которое мы рассматриваем как возможную причину повышения GABAAR1, однако это предположение нуждается в экспериментальной проверке в дальнейшем.

Для оценки изменений с возрастом глутаматергической и ГАМКергической систем и их возможного вклада в развитие признаков БА мы провели анализ экспрессии генов в гиппокампе крыс OXYS и Вистар разного возраста, используя данные RNA-Seq. Наш анализ выявил их значительные изменения с возрастом в гиппокампе крыс обеих линий, однако мы не обнаружили межлинейных различий. Таким образом, уровень мРНК генов, кодирующих компоненты сигнальных путей глутамата и ГАМК, не различаются между крысами Вистар и OXYS на всех стадиях развития признаков БА. Исключением, которое мы отметили, являются гены, кодирующие рецепторы глутамата (*Grin3b* и *Grm6*), глутаматдекарбоксилазу 2 (*Gad2*), субъединицу белка G (*Gng12*), семейство носителей растворенных веществ (*Slc1a1* и *Slc1a2*), фосфолипазу A2 (*Pla2g2d*, *Pla2g5* и *Pla2g6*), фосфолипазу C (*Plcl1*), протенинфосфатазу 3 (*Ppp3r1*) и транспортирующий белок кинезин 2 (*Trak2*). Тем не менее изменения в экспрессии этих генов на разных стадиях нейродегенерации у крыс OXYS не позволили нам сформулировать какую-либо гипотезу о вкладе этих генов в патогенез БА. Напротив, у крыс обеих линий мы выявили явное зависимое от возраста снижение экспрессии генов, связанных с передачей сигналов глутамат/ГАМК.

В целом, наши результаты указывают на отсутствие изменений либо компенсаторную активацию в глутамат- и ГАМКергической системах при старении и развитии признаков БА у крыс OXYS, которые, вероятно, являются следствием развития нейродегенеративных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно Cox et al. [5], снижение глутаматергической передачи может быть использовано в качестве биомаркера перехода от физиологического к патологическому старению. Исходя из результатов нашего исследования, мы можем заключить, что в гиппокампе наблюдается значительное снижение передачи сигналов глутамата и ГАМК с возрастом у крыс Вистар, однако в гиппокампе крыс OXYS

не выявлено существенных изменений или компенсаторного повышения в этой системе при развитии нейродегенеративных процессов, характерных для БА. Исследование патогенеза БА осложняется гетерогенностью заболевания, различными патофизиологическими сценариями и существованием нескольких молекулярных подтипов заболевания [53]. Необходимы дальнейшие исследования для выявления изменений в балансе нейромедиаторных систем. Эти знания станут важным шагом на пути к персонализированной медицине для пациентов с этим нейродегенеративным заболеванием.

Вклад авторов. А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова – проведение экспериментов; А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова, Д.В. Телегина, Н.Г. Колосова – обсуждение результатов исследования; А.О. Бурняшева, Д.В. Телегина – написание текста; Н.Г. Колосова,

Н.А. Стефанова, Д.В. Телегина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00044).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все проводимые исследования выполнялись на крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контроль) на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН в соответствии с этическими нормами Директивы Европейского союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. Все эксперименты были одобрены и проведены в соответствии с руководящими принципами этического комитета по испытаниям на животных в ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия (постановление № 12000-496 от 2 апреля 1980 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, R., and Reddy, P. H. (2017) Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **57**, 1041-1048, doi: 10.3233/JAD-160763.
2. Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 595-608, doi: 10.15252/emmm.201606210.
3. Wyss-Coray, T. (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation, *Nature*, **539**, 180-186, doi: 10.1038/nature20411.
4. Polanco, J. C., Li, C., Bodea, L. G., Martinez-Marmol, R., Meunier, F. A., and Götz, J. (2017) Amyloid- β and tau complexity – towards improved biomarkers and targeted therapies, *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 22-39, doi: 10.1038/nrneurol.2017.162.
5. Cox, M. F., Hascup, E. R., Bartke, A., and Hascup, K. N. (2022) Friend or foe? Defining the role of glutamate in aging and Alzheimer's disease, *Front. Aging*, **3**, 929474, doi: 10.3389/fragi.2022.929474.
6. Hampe, C. S., Mitoma, H., and Manto, M. (2018) GABA and glutamate: their transmitter role in the CNS and pancreatic islets, in *GABA and Glutamate – New Developments in Neurotransmission Research*, IntechOpen, Book Chapter 5, pp. 65-90, doi: 10.5772/intechopen.70958.
7. Sears, S. M. S., and Hewett, S. J. (2021) Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **246**, 1069-1083, doi: 10.1177/1535370221989263.
8. Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Korbolina, E. E., Fursova, A. Z., and Kozhevnikova, O. S. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a genetic model of premature aging and age-related diseases, *Adv. Gerontol.*, **27**, 336-340, doi: 10.1134/S2079057014040146.
9. Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Korbolina, E. E., Kiseleva, E., Maksimova, K. Y., and Kolosova, N. G. (2015) Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats, *Oncotarget*, **6**, 1396-1413, doi: 10.18632/oncotarget.2751.
10. Kolosova, N. G., Kozhevnikova, O. S., Muraleva, N. A., Rudnitskaya, E. A., Rumyantseva, Y. V., Stefanova, N. A., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., Fursova, A. Z. (2022) SkQ1 as a tool for controlling accelerated senescence program: experiments with OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1552-1562, doi: 10.1134/S0006297922120124.
11. Stefanova, N. A., Maksimova, K. Y., Kiseleva, E., Rudnitskaya, E. A., Muraleva, N. A., and Kolosova, N. G. (2015) Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology, *J. Pineal. Res.*, **59**, 163-177, doi: 10.1111/JPI.12248.
12. Telegina, D. V., Antonenko, A. K., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2022) The glutamate/GABA System in the retina of male rats: effects of aging, neurodegeneration, and supplementation with melatonin and antioxidant SkQ1, *Biogerontology*, **23**, 571-585, doi: 10.1007/s10522-022-09983-w.

13. Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2023) The rat brain transcriptome: from infancy to aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1462, doi: 10.3390/ijms24021462.
14. Stefanova, N. A., Maksimova, K. Y., Rudnitskaya, E. A., Muraleva, N. A., and Kolosova, N. G. (2018) Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *BMC Genomics*, **19**, 51-63, doi: 10.1186/S12864-018-4480-9.
15. Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2019) Excitatory amino acid transporters (EAATs): glutamate transport and beyond, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5674, doi: 10.3390/ijms20225674.
16. Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., Lee, E. (2019) The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics, *Neuropharmacology*, **161**, 1-37, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.002.
17. Snytnikova, O., Telegina, D., Savina, E., Tsentalovich, Y., and Kolosova, N. (2023) Quantitative metabolomic analysis of the rat hippocampus: effects of age and of the development of Alzheimer's disease-like pathology, *J. Alzheimer's Disease*, doi: 10.3233/JAD-230706, in press.
18. Schubert, F., Gallinat, J., Seifert, F., and Rinneberg, H. (2004) Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla, *NeuroImage*, **21**, 1762-1771, doi: 10.1016/j.neuroimage.2003.11.014.
19. Kaiser, L.G., Schuff, N., Cashdollar, N., and Weiner, M. W. (2005) Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T, *Neurobiol. Aging*, **26**, 665-672, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.001.
20. Chang, L., Jiang, C. S., and Ernst, T. (2009) Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites, *Magn. Reson. Imaging*, **27**, 142-145, doi: 10.1016/j.mri.2008.06.002.21.
21. Huang, D., Liu, D., Yin, J., Qian, T., Shrestha, S., and Ni, H. (2017) Glutamate-glutamine and GABA in brain of normal aged and patients with cognitive impairment, *Eur. Radiol.*, **27**, 2698-2705, doi: 10.1007/S00330-016-4669-8.
22. Rozycka, A., Charzynska, A., Misiewicz, Z., Maciej Stepniewski, T., Sobolewska, A., Kossut, M., and Liguz-Leczmar, M. (2019) Glutamate, GABA, and presynaptic markers involved in neurotransmission are differently affected by age in distinct mouse brain regions, *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 4449-4461, doi: 10.1021/acschemneuro.9b00220.
23. Segovia, G., Porrás, A., Del Arco, A., and Mora, F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective, *Mech. Ageing Dev.*, **122**, 1-29, doi: 10.1016/S0047-6374(00)00225-6.
24. Dong, Y., and Brewer, G. J. (2019) Global metabolic shifts in age and Alzheimer's disease mouse brains pivot at NAD⁺/NADH redox sites, *J. Alzheimer's Dis.*, **71**, 119-140, doi: 10.3233/JAD-190408.
25. Mira, R. G., and Cerpa, W. (2020) Building a bridge between NMDAR-mediated excitotoxicity and mitochondrial dysfunction in chronic and acute diseases, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **41**, 1413-1430, doi: 10.1007/S10571-020-00924-0.
26. Rodríguez-Giraldo, M., González-Reyes, R. E., Ramírez-Guerrero, S., Bonilla-Trilleras, C. E., Guardo-Maya, S., and Nava-Mesa, M. O. (2022) Astrocytes as a therapeutic target in Alzheimer's disease-comprehensive review and recent developments, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13630, doi: 10.3390/ijms232113630.
27. Yeung, J. H. Y., Palpagama, T. H., Wood, O. W. G., Turner, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2021) EAAT2 expression in the hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus in Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 702824, doi: 10.3389/fncel.2021.702824.
28. Babaei, P. (2021) NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharmacol.*, **908**, 174310, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174310.
29. Kumar, A. (2015) NMDA receptor function during senescence: implication on cognitive performance, *Front. Neurosci.*, **9**, 473, doi: 10.3389/fnins.2015.00473.
30. Kumar, A., and Foster, T. C. (2018) Alteration in NMDA receptor mediated glutamatergic neurotransmission in the hippocampus during senescence, *Neurochem. Res.*, **44**, 38-48, doi: 10.1007/S11064-018-2634-4.
31. Avila, J., Llorens-Martín, M., Pallas-Bazarra, N., Bolos, M., Perea, J. R., Rodríguez-Matellán, A., and Hernandez, F. (2017) Cognitive decline in neuronal aging and Alzheimer's disease: role of NMDA receptors and associated proteins, *Front. Neurosci.*, **11**, 626, doi: 10.3389/fnins.2017.00626.
32. Cercato, M. C., Vázquez, C. A., Kornisiuk, E., Aguirre, A. I., Colettis, N., Snitkofsky, M., Jerusalinsky, D. A., and Baez, M. V. (2017) GluN1 and GluN2A NMDA receptor subunits increase in the hippocampus during memory consolidation in the rat, *Front. Behav. Neurosci.*, **10**, 242, doi: 10.3389/fnbeh.2016.00242.
33. Ge, Y., and Wang, Y. T. (2023) GluN2B-containing NMDARs in the mammalian brain: pharmacology, physiology, and pathology, *Front. Mol. Neurosci.*, **16**, 1190324, doi: 10.3389/fnmol.2023.1190324.
34. Yeung, J. H. Y., Walby, J. L., Palpagama, T. H., Turner, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2021) Glutamatergic receptor expression changes in the Alzheimer's disease hippocampus and entorhinal cortex, *Brain Pathol.*, **31**, e13005, doi: 10.1111/BPA.13005.
35. Qu, W., Yuan, B., Liu, J., Liu, Q., Zhang, X., Cui, R., Yang, W., and Li, B. (2021) Emerging role of

- AMPA receptor subunit GluA1 in synaptic plasticity: implications for Alzheimer's disease, *Cell Prolif.*, **54**, e12959, doi: 10.1111/cpr.12959.
36. Li, Y., Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., and Zheng, H. (2016) Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **8**, 31, doi: 10.3389/fnagi.2016.00031.
37. Bi, D., Wen, L., Wu, Z., and Shen, Y. (2020) GABAergic dysfunction in excitatory and inhibitory (E/I) imbalance drives the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement.*, **16**, 1312-1329, doi: 10.1002/alz.12088.
38. Lee, S. E., Lee, Y., and Lee, G. H. (2019) The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain, *Arch. Pharm. Res.*, **42**, 1031-1039, doi: 10.1007/s12272-019-01196-z.
39. Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C. Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R. D., and Huang, Z. J. (2007) GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex, *Neuron*, **54**, 889-903, doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.015.
40. Lau, C. G., and Murthy, V. N. (2012) Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67, *J. Neurosci.*, **32**, 8521-8531, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1245-12.2012.
41. Sandhu, K. V., Lang, D., Müller, B., Nullmeier, S., Yanagawa, Y., Schwegler, H., and Stork, O. (2014) Glutamic acid decarboxylase 67 haploinsufficiency impairs social behavior in mice, *Genes Brain Behav.*, **13**, 439-450, doi: 10.1111/GBB.12131.
42. Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D., and Baekkeskov, S. (1997) Epilepsy in mice deficient in the 65-KDa isoform of glutamic acid decarboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14060-14065, doi: 10.1073/PNAS.94.25.14060.
43. Toritsuka, M., Yoshino, H., Makinodan, M., Ikawa, D., Kimoto, S., Yamamuro, K., Okamura, K., Akamatsu, W., Okada, Y., Matsumoto, T., Hashimoto, K., Ogawa, Y., Saito, Y., Watanabe, K., Aoki, C., Takada, R., Fukami, S. I., Hamano-Iwasa, K., Okano, H., and Kishimoto, T. (2021) Developmental dysregulation of excitatory-to-inhibitory GABA-polarity switch may underlie schizophrenia pathology: a monozygotic-twin discordant case analysis in human IPS cell-derived neurons, *Neurochem. Int.*, **150**, e105179, doi: 10.1016/J.NEUINT.2021.105179.
44. Benes, F. M., Lim, B., Matzilevich, D., Walsh, J. P., Subburaju, S., and Minns, M. (2007) Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10164-10169, doi: 10.1073/pnas.0703806104.
45. Lanoue, A. C., Dumitriu, A., Myers, R. H., Soghomonian, J. J. (2010) Decreased glutamic acid decarboxylase mRNA expression in prefrontal cortex in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **226**, 207-217, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.09.001.
46. Wang, Y., Wu, Z., Bai, Y. T., Wu, G. Y., and Chen, G. (2017) Gad67 haploinsufficiency reduces amyloid pathology and rescues olfactory memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 73, doi: 10.1186/s13024-017-0213-9.
47. Ethiraj, J., Palpagama, T. H., Turner, C., van der Werf, B., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2021) The effect of age and sex on the expression of GABA signaling components in the human hippocampus and entorhinal cortex, *Sci. Rep.*, **11**, 21470, doi: 10.1038/s41598-021-00792-8.
48. Krantic, S., Isorce, N., Mechawar, N., Davoli, M. A., Vignault, E., Albuquerque, M., Chabot, J. G., Moysse, E., Chauvin, J. P., Aubert, I., McLaurin, J., and Quirion, R. (2012) Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid- β Toxicity *in vitro* and are decreased in number in the Alzheimer's disease TgCRND8 mouse model, *J. Alzheimers Dis.*, **29**, 293-308, doi: 10.3233/JAD-2011-110830.
49. Ulrich, D. (2015) Amyloid- β impairs synaptic inhibition via GABAA receptor endocytosis, *J. Neurosci.*, **35**, 9205-9210, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0950-15.2015.
50. Palpagama, T. H., Sagniez, M., Kim, S., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., and Kwakowsky, A. (2019) GABAA receptors are well preserved in the hippocampus of aged mice, *eNeuro*, **6**, 1-13, doi: 10.1523/ENEURO.0496-18.2019.
51. Rissman, R. A., and Mobley, W. C. (2011) Implications for treatment: GABAA receptors in aging, down syndrome and Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, **117**, 613-622, doi: 10.1111/J.1471-4159.2011.07237.X.
52. Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., Rudnitskaya, E. A., Korbolina, E. E., Muraleva, N. A., and Kolesova, N. G. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease, *Cell Cycle*, **13**, 898-909, doi: 10.4161/CC.28255.
53. Neff, R. A., Wang, M., Vatansever, S., Guo, L., Ming, C., Wang, Q., Wang, E., Horgusluoglu-Moloch, E., Song, W. M., Li, A., Castranio, E. L., Tcw, J., Ho, L., Goate, A., Fossati, V., Noggle, S., Gandy, S., Ehrlich, M. E., Katsel, P., Schadt, E., Cai, D., Brennand, K. J., Haroutunian, V., and Zhang, B. (2021) Molecular subtyping of Alzheimer's disease using RNA sequencing data reveals novel mechanisms and targets, *Sci. Adv.*, **7**, eabb5398, doi: 10.1126/sciadv.abb5398.

CHANGES IN THE GLUTAMATE/GABA SYSTEM IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS WITH AGE AND DURING THE ALZHEIMER'S DISEASE SIGNS DEVELOPMENT

A. O. Burnyasheva, N. A. Stefanova, N. G. Kolosova*, and D. V. Telegina

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru*

GABA and glutamate are the most abundant neurotransmitters in the CNS and play a pivotal part in synaptic stability/plasticity. Glutamate and GABA homeostasis is important for healthy aging and reducing the risk of various neurological diseases, while long-term imbalance can contribute to the development of neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD). Its normalization discussed as a promising strategy for the prevention and/or treatment of AD, however, data on changes in the GABAergic and glutamatergic systems in with age, as well as in the dynamics of AD development, are limited. It is not clear whether the imbalance of the excitatory/inhibitory systems is a cause or a consequence of the development of the disease. Here we analyzed age-related alterations of the expression of glutamate, GABA, and enzymes that synthesize them (glutaminase, glutamine synthetase, GABA-T, and GAD67), transporters (GLAST, GLT-1, and GAT1), and relevant receptors (GluA1, NMDAR1, NMDA2B, and GABA_Ar1) in the whole hippocampus of Wistar rats and of senescence-accelerated OXYS rats, a model of the most common (> 95%) sporadic AD. Our results suggest that there is a decline of glutamate and GABA signaling with aging in the hippocampus of the both rat strains. However, we have not identified significant changes or compensatory enhancements in this system in the hippocampus of OXYS rats during development of neurodegenerative processes that are characteristic of AD.

Keywords: aging, Alzheimer's disease, glutamate, GABA, hippocampus, OXYS rats

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЛИНИИ МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *NFE2L2* (*NRF2*)

© 2023 Е.С. Егоров¹, Н.Д. Кондратенко^{2,3}, О.А. Аверина^{2,4,5}, О.А. Пермяков^{4,5},
М.А. Емельянова^{4,5}, А.С. Приходько^{1,2}, Л.А. Зиновкина¹,
П.В. Сергиев^{2,4,5}, Р.А. Зиновкин^{2,6*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: roman.zinovkin@gmail.com

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Российский геронтологический научно-клинический центр, 129226 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Институт функциональной геномики, 119991 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁶ НИУ ВШЭ, 101000 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.09.2023

После доработки 22.11.2023

Принята к публикации 23.11.2023

Транскрипционный фактор NRF2 участвует в процессах воспаления, поддержании редокс-баланса, метаболизме ксенобиотиков, а также представляет особый интерес для изучения старения. В настоящей работе с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 были получены мыши NRF2^{ΔNeh2}, у которых белок NRF2 содержит замену восьми аминокислотных остатков на N-конце, непосредственно перед функциональным доменом Neh2, который обеспечивает связывание NRF2 со своим ингибиторным регулятором KEAP1. При скрещиваниях гетерозигот NRF2^{wt/ΔNeh2} частота рождения гомозиготных мутантных мышей была ниже ожидаемой, что сопровождалось их повышенной эмбриональной смертностью и визуальными признаками анемии. Мышиные эмбриональные фибробласты (МЭФы) гомозигот NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} проявляли меньшую устойчивость к окислительному стрессу по сравнению с МЭФами дикого типа. В тканях гомозиготных животных NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} наблюдалось уменьшение относительного количества мРНК генов-мишеней NRF2: NAD(P)H:хинон оксидоредуктазы-1 (*Nqo1*); альдегидоксидазы-1 (*Aox1*); глутатион-S-трансферазы A4 (*Gsta4*); при этом увеличивалась экспрессия генов, кодирующих монокитарный хемоаттрактантный белок 1 (*Ccl2*), молекулы адгезии 1 клеток сосудов (*Vcam1*) и хемокина *Cxcl8*. Таким образом, полученная мутация в гене *Nfe2l2*, кодирующем NRF2, частично нарушала функции этого транскрипционного фактора, что расширяет представления о функциональной роли неструктурированного N-конца NRF2. Полученная линия мышей NRF2^{ΔNeh2} может быть использована как модельный объект для изучения эмбриональной смертности, а также различных патологий, сопряжённых с окислительным стрессом и повышенным уровнем воспалительных реакций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транскрипционный фактор NRF2, трансгенные животные, воспаление, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523120035, **EDN:** NJKYVM

ВВЕДЕНИЕ

NRF2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, ядерный фактор 2, родственник эритроидному фактору 2) – фактор транскрипции,

контролирующий экспрессию множества генов, продукты которых обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. В цитоплазме NRF2 связан с белком KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1), который в обычных условиях способ-

* Адресат для корреспонденции.

ствуется постоянной протеасомной деградации NRF2 [1]. В то же время KEAP1 является редокс-чувствительным регулятором активности NRF2: при проникновении в клетку окислителей и электрофилов происходит тиольная модификация аминокислотных остатков цистеина, входящих в состав KEAP1 [2]. Эта модификация блокирует KEAP1 в связанном с NRF2 состоянии. Из-за отсутствия «вакантных» негативных регуляторов новосинтезированный NRF2 накапливается в цитоплазме, а затем перемещается в ядро. В ядре NRF2 в комплексе со своими коактиваторами, основными из которых являются малые белки семейства Maf, распознаёт ARE-последовательности (ARE – элементы антиоксидантного ответа) в промоторах своих генов-мишеней и запускает их транскрипцию [3].

В структуре NRF2 присутствует 7 высококонсервативных Neh (NRF2-ECH homology, NRF2-ECH гомологичных)-доменов [4, 5]. В N-концевой части белка находится домен Neh2 (а.о. 16–86), включающий две аминокислотные последовательности, известные как DLG- и ETGE-мотивы [6]. С этими последовательностями связывается негативный регулятор NRF2 KEAP1. KEAP1, являясь адаптерным белком для E3-убиквитинлигазного комплекса Cullin 3 (Cul3), стимулирует убиквитинирование семи остатков лизина, располагающихся в домене Neh2 NRF2 между DLG- и ETGE-мотивами, и способствует протеасомной деградации последнего [6, 7]. Домены Neh1 (а.о. 435–562), Neh4 (а.о. 112–134), Neh5 (а.о. 183–201) и Neh7 (а.о. 209–316) отвечают за взаимодействие NRF2 со своими коактиваторами и корепрессорами [3, 8, 9]. В домене Neh6 (а.о. 338–388) располагаются две последовательности-дегрона, которые распознаёт E3-убиквитинлигаза β -TrCP [10, 11]. В C-концевой части белка находится домен Neh3 (а.о. 562–605), который отвечает за распознавание ARE-элементов в промоторах генов-мишеней NRF2 и содержит VFLVPK-мотив, помогающий NRF2 связываться с хеликазой CHD6 [12]. При всей сложности организации NRF2 этот белок является частично неупорядоченным, а его домены Neh2, Neh7 и Neh1 могут структурироваться лишь на некоторое время [13].

NRF2 активирует транскрипцию генов 2-й фазы детоксификации ксенобиотиков, в про-

цессе которой модифицированные соединения выводятся из клетки. NRF2 также принимает активное участие в защите клетки от электрофильного стресса [14]. Также NRF2 контролирует экспрессию генов, продукты которых участвуют в биосинтезе глутатиона, а также ферменты, которые прямо или косвенно нейтрализуют активные формы кислорода (АФК): NAD(P)H:хинон оксидоредуктазу (NQO1), гемоксигеназу-1 (HO1), каталазу (CAT). Уменьшение количества АФК, в свою очередь, способствует прекращению воспалительных реакций. При снижении экспрессии *Nfe2l2* происходит повышение уровня воспаления, что может привести к повреждениям органов и тканей [15]. При снижении экспрессии *Nfe2l2* в моноцитах также повышается продукция провоспалительных цитокинов [16]. На мышинных моделях показано повышение уровня АФК, приводящее к продолжительному окислительному стрессу после черепно-мозговых травм [17].

Для исследования функции транскрипционных факторов широко используются модельные организмы, нокаутные по выбранному гену. Мыши, нокаутные по *Nfe2l2*, кодирующему транскрипционный фактор NRF2, были получены более четверти века назад [18], и все последующие эксперименты проводились исключительно на этой линии. У этих мышей в ген *Nfe2l2* был вставлен цистрон из лактозного оперона, что приводило к невозможности синтеза функциональных мРНК и белкового продукта. Однако использование нокаутных животных зачастую приводит к появлению вторичных эффектов, которые затрудняют интерпретацию полученных результатов. Вполне вероятно, что при полном отсутствии какого-либо транскрипционного фактора вторичные эффекты могут быть обусловлены отсутствием действия связанных с ним кофакторов. В связи с этим представляется актуальным получение новых моделей, в которых не нарушена целостность белковой структуры транскрипционных факторов, а вместо этого внесены мутации в их домены. Ещё одной проблемой при удалении гена может также явиться удаление одной или нескольких некодирующих РНК, встречающихся в интронах и экзонах.

В данной работе была получена новая мутантная линия мышей NRF2^{ΔNeh2}, несущая

Принятые сокращения: МЭФы – мышинные эмбриональные фибробласты; AOX1 – альдегидоксидаза-1; CCL2 – белок-аттрактант моноцитов; GOx – глюкозооксидаза; GSTA4 – глутатион-S-трансфераза A4; HMOX1 – гемоксигеназа-1; KEAP1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1; Neh – Nrf2-ECH гомологичный; NRF2 – ядерный фактор 2, родственник эритроидному фактору 2; NQO1 – NAD(P)H:хинон оксидоредуктаза; VCAM-1 – молекула адгезии 1 клеток сосудов.

замену 8 аминокислот на *N*-концевом участке *NRF2*, осуществлена характеристика мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФов) и определены изменения в уровне мРНК ряда генов-мишеней *NRF2* в различных тканях этих животных. Данная линия мышей может быть использована как модельный объект для изучения эмбриональной смертности, различных патологий, сопровождающихся окислительным стрессом и воспалением, а также для изучения процессов старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание животных. Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках (система IVC, «TECNIPLAST S.p.A.», Италия) при свободном доступе к гранулированному комбикорму и воде, очищенной обратным осмосом; в среде, свободной от специфических патогенов, при световом режиме 12/12 (включение света в 09:00), в помещениях с кратностью воздухообмена не менее 15 об./ч, с температурой воздуха 20–24 °С, влажностью 30–70%. В качестве подстилки использована деревянная щепка с минимальным образованием пыли. В качестве обогащения среды использованы укрытия и строительные материалы для гнёзд из натуральных материалов. Все материалы, поступающие к животным, стерилизованы путём автоклавирования.

Создание линии трансгенных животных. Работа с мышами была поддержана локальной комиссией по биоэтике ООО «НИИ Митохондриологии МГУ», протокол № 79 от 28 апреля 2015 г. Изменение в гене *Nfe2l2* осуществляли с применением технологии CRISPR/Cas9. Гидовая РНК (5'-GACTTGGAGTTGCCACCGCC) к первому экзону этого гена была выбрана с использованием сервиса Feng Zhang lab's (<https://www.zlab.bio/resources>). Соответствующая единая гидовая РНК (егРНК) была получена путём транскрипции T7 *in vitro* (MEGAscript™ T7 Transcription Kit, «Thermo Fisher Scientific») на матрице, полученной путём ПЦР-амплификации плазмиды pX458 [19] с прямым праймером: 5'-TGTAATACGACTCACTATAGGGACTTGGAGTTGCCACCGCCGTTTAGAGCTAGAAATAGC и обратным праймером: 5'-AGCACCGACTCGGTGCCACT. Полученную егРНК смешивали с мРНК Cas9 (GeneArt™ CRISPR Nuclease, «Thermo Fisher Scientific») в ТЕ-буфере (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM ЭДТА, pH 8).

Одноклеточные эмбрионы для последующей микроинъекции генетической конструк-

ции были выделены из яйцевода самок мышей согласно стандартному протоколу [20]. Самки-доноры зигот предварительно были гормонально стимулированы по схеме, описанной Averina et al. [21], и оплодотворены самцами соответствующей линии [21].

Микроинъекцию генетической конструкции в пронуклеус оплодотворённой яйцеклетки осуществляли в среде для промывки ооцитов с феноловым красным, pH 7,4, без гепарина («CooperSurgical, Inc.», США), окружённой вазелиновым маслом (АО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, Россия), на инвертированном микроскопе (ECLIPSE Ti, «Nikon», Япония) с помощью двух микроманипуляторов (TransferMan 4R, «Eppendorf», Германия), согласно протоколу [20].

Зиготы после микроинъекции инкубировали с 5% CO₂ при 37 °С в среде Sequential Fert™ с феноловым красным («CooperSurgical, Inc.»).

После инкубации выжившие эмбрионы были подсажены в воронку яйцевода суррогатным самкам, согласно стандартному протоколу [20].

После рождения и завершения периода лактации у мышей, развившихся из эмбрионов, которые перенесли микроинъекцию генетической конструкции, производили отбор биологического материала путём отсечения кончика хвоста, согласно руководству FELASA по генотипированию трансгенных грызунов [22]. Образцы тканей для идентификации генотипа мышей замораживали при –20 °С до проведения генотипирования.

Полученных гетерозиготных мышей (*Nrf2*^{wt/ΔNeh2}) во избежание потенциального влияния вторичных мутаций перекрещивали на инбредную линию C57BL/6J. Гомозиготные особи *Nrf2*^{ΔNeh2/ΔNeh2} и мыши дикого типа *Nrf2*^{wt/wt} были получены от скрещивания гетерозиготных пар *Nrf2*^{wt/ΔNeh2}.

Генотипирование мышей. Для выделения геномной ДНК из образцов тканей использовали метод щелочной экстракции [23] с дополнительной очисткой ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Для генотипирования использовали набор Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) с 50 нг геномной ДНК. На матрице ДНК проводили ПЦР1 с набором праймеров mNrf-F476 (5'-GCAGGCTATCTCCTAGTTCT) и mNrf-R668 (5'-CGGCTTCTTGGCACAG), а также ПЦР2 с праймерами mNrf-F476 и mNrf-R1153 (5'-GACAGGCGTGATCTTACAG). Условия ПЦР: 95 °С – 5 мин, затем 35 циклов (95 °С – 25 с, 60 °С – 25 с, 72 °С – 25 с). Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1,5%-ном агарозном геле.

Получение МЭФов. Получение МЭФов из 10–14-дневных эмбрионов мышей, полученных при скрещивании гетерозигот $Nrf2^{wt/\Delta Nch2}$, проводили согласно методике, описанной в статье Qiu et al. [24]. Клетки культивировали на питательной среде Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) («ПанЭко», Россия).

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Выделение общей клеточной РНК производили с помощью набора реактивов «QuickRNA MiniPrep» («ZymoResearch», США) по протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific»), качество РНК подтверждали электрофоретически. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript III («Thermo Fisher Scientific»), как описано ранее [25], для последующего анализа с помощью ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем EvaGreen I («Синтол», Россия). Для ПЦР в реальном времени использовали следующие праймеры: *Hmox1* (прямой: 5'-CACGCATATACCCGCTACC; обратный: 5'-TCATCTCCAGAGTGTTCATTCG), *Nqo1* (прямой: 5'-GTCCTCCATCAAGATTCG; обратный: 5'-GCTAACTGCTAACTGCTAA), *Aox1* (прямой: 5'-CATAGGTCAGGTTGAAGGT; обратный: 5'-GGCAGGAATCTTGTATTGG), *Gsta4* (прямой: 5'-AGCAACATTCCTACAATTAAGAAGT; обратный: 5'-TCCTGACCACCTCAACATAG), *Vcam1* (прямой: 5'-CCCTCCACAAACCAAGCC; обратный: 5'-CCATTCAGTCACTTCAACG), *Il-6* (прямой: 5'-ACCGCTATGAAGTTCCTCTC; обратный: 5'-CTCTGTGAAGTCTCCTCTCC), *Cxcl8* (прямой: 5'-ACTTCAAGAACATCCAGAGC; обратный: 5'-CTTCCAGGTCAGTTAGCC). Нуклеотидные последовательности праймеров для *Ccl2* и референсных генов *Rpl32* и *Gapdh* приведены в работе Zinovkin et al. [26].

Вестерн-блот. МЭФы лизировали в горячем SDS-буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерина; 50 мМ ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) 5 мин при 94 °С. Белки разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном SDS-ПААГ, переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad», США), последовательно инкубировали с антителами к NRF2 («Invitrogen», США) и вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, мечеными пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich», США). Для пероксидазы использовали субстрат West Dura Extended Duration Substrate («Thermo Fisher Scientific»), изображения получали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc («Bio-Rad»).

Цитотоксический тест. Резазуриновый тест проводили по стандартному протоколу, как описано ранее [25]. Опыты по изучению действия окислительного стресса на выживаемость МЭФов проводили при действии на клетки 250 мкМ H_2O_2 («Экотекс», Россия) и 3 ед./мл глюкозооксидазы (GOx) («Sigma-Aldrich») в течение 3 ч, $n = 3$.

Секвенирование ДНК. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer («Thermo Fisher Scientific»).

Статистический анализ. Анализ результатов скрещивания мышей проводили с помощью критерия χ^2 . Разницу в уровне экспрессии генов между группами, а также в выживаемости МЭФов определяли с помощью непарного t -теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение мышей с мутацией в гене *Nfe2l2*.

С использованием технологии CRISPR/Cas9 и гидовой РНК, соответствующей первому экзону гена *Nfe2l2*, была получена самка мыши F0, в геноме которой имелась делеция 284 нт, затрагивающая границу первых экзона и интрона гена *Nfe2l2* (рис. 1). Для устранения влияния возможных вторичных мутаций, вызванных неспецифическим действием геномного редактирования, проводили последовательные скрещивания гетерозигот с инбредными мышами линии C57BL/6J на протяжении десяти поколений. Затем при скрещивании гетерозигот были получены разнополые гомозиготные особи, а также особи дикого типа и гетерозиготы.

Наблюдаемая делеция в участке, затрагивающем сайт сплайсинга (5'-CAG | GTGCTG CCC) между первыми экзоном и интроном гена *Nfe2l2*, теоретически могла приводить к нарушению сплайсинга пре-мРНК *Nfe2l2* и последующей деградации этого транскрипта. Таким образом, можно было бы ожидать получения животного, нокаутного по *Nfe2l2*. Однако секвенирование кДНК гена *Nfe2l2* обнаружило делецию кодонов, кодирующих 8 аминокислотных остатков 3'-концевого участка первого экзона (PPGLQSQQ), которые были замещены двумя аминокислотами (RW), образовавшимися при трансляции некодирующего участка первого интрона (рис. 1, б). При этом остальная часть NRF2 осталась неизменной. На основании полученных данных был сле-

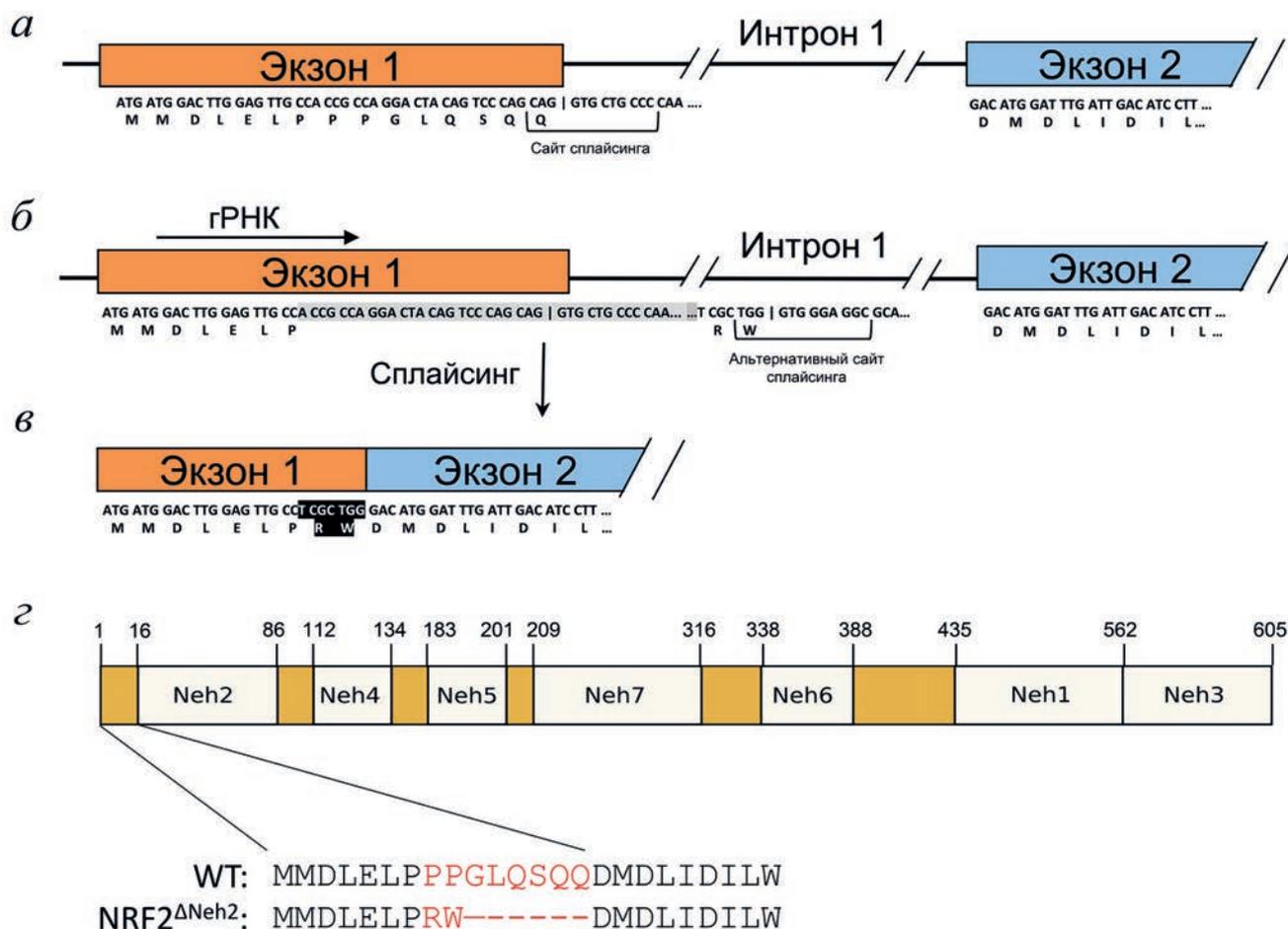


Рис. 1. Схема получения мышей NRF2^{ΔNeh2} с мутацией в гене *Nfe2l2*. *а* – Участок последовательности пре-мРНК гена *Nfe2l2* дикого типа (WT). *б* – Последовательность пре-мРНК гена *Nfe2l2* с делецией, полученной с помощью CRISPR/Cas9 и гидовой РНК (гРНК). Серым цветом обозначен делегированный участок гена, также на схеме отмечен альтернативный сайт сплайсинга в первом интроне гена. *в* – Последовательность зрелой сплайсированной мРНК гена *Nfe2l2* с внесённой мутацией (замены аминокислот выделены чёрным цветом). *з* – Доменная схема белка NRF2 и сравнение аминокислотных последовательностей этих белков у мышей NRF2^{ΔNeh2} и WT. Внесённая мутация находится на N-конце NRF2 и представляет собой делецию 8 а.о. (PPGLQSQQ), которые были замещены двумя аминокислотами (RW), образовавшимися при трансляции некодирующего участка первого интрона. Мутация затрагивает позиции 8–15, которые находятся рядом с доменом Neh2, отвечающим за связывание NRF2 со своим негативным регулятором KEAP1

лан вывод, что в полученной линии мышей NRF2^{ΔNeh2} происходит альтернативный сплайсинг за счёт активности скрытого донорного сплайс-сайта (5'-TGG | GTGGGAGGC) в первом интроне гена *Nfe2l2*. Несмотря на то что нам не удалось получить мышью, нокаутную по гену *Nfe2l2*, работа на этой уникальной модели с мутацией в этом гене была продолжена.

Гомозиготные мыши NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} проявляют повышенную эмбриональную летальность. Всего в результате скрещиваний гетерозиготных мышей было получено 22 особи дикого типа (37%), 34 гетерозигот (57%) и 3 гомозигот (5%). Количество полученных генотипов не соответствовало менделевскому типу наследования (P = 0,001 по тесту χ²), что привело к предположению о повышенной внутриутробной летальности гомозигот. Действительно,

при анализе эмбрионов, полученных на 9, 11 и 17–21 дни после зачатия, были обнаружены признаки анемии и смерть некоторых гомозиготных зародышей (рис. 2). Всего было проанализировано 55 эмбрионов, из которых 12 были генотипированы как особи дикого типа (22%), 29 – как гетерозиготы (53%) и 14 – как гомозиготы (25%) (P = 0,81 по тесту χ²).

МЭФы гомозиготных NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2}-мышей обладают пониженной устойчивостью к окислительному стрессу. Окислительный стресс в МЭФах индуцировали добавлением 250 мкМ H₂O₂ или 3 ед./мл GOx на 3 ч. При индукции окислительного стресса с помощью H₂O₂ выживаемость МЭФов, полученных от гомозиготных мутантных мышей, была незначительно меньше, чем у клеток, полученных от особей дикого типа (рис. 3). При добавле-

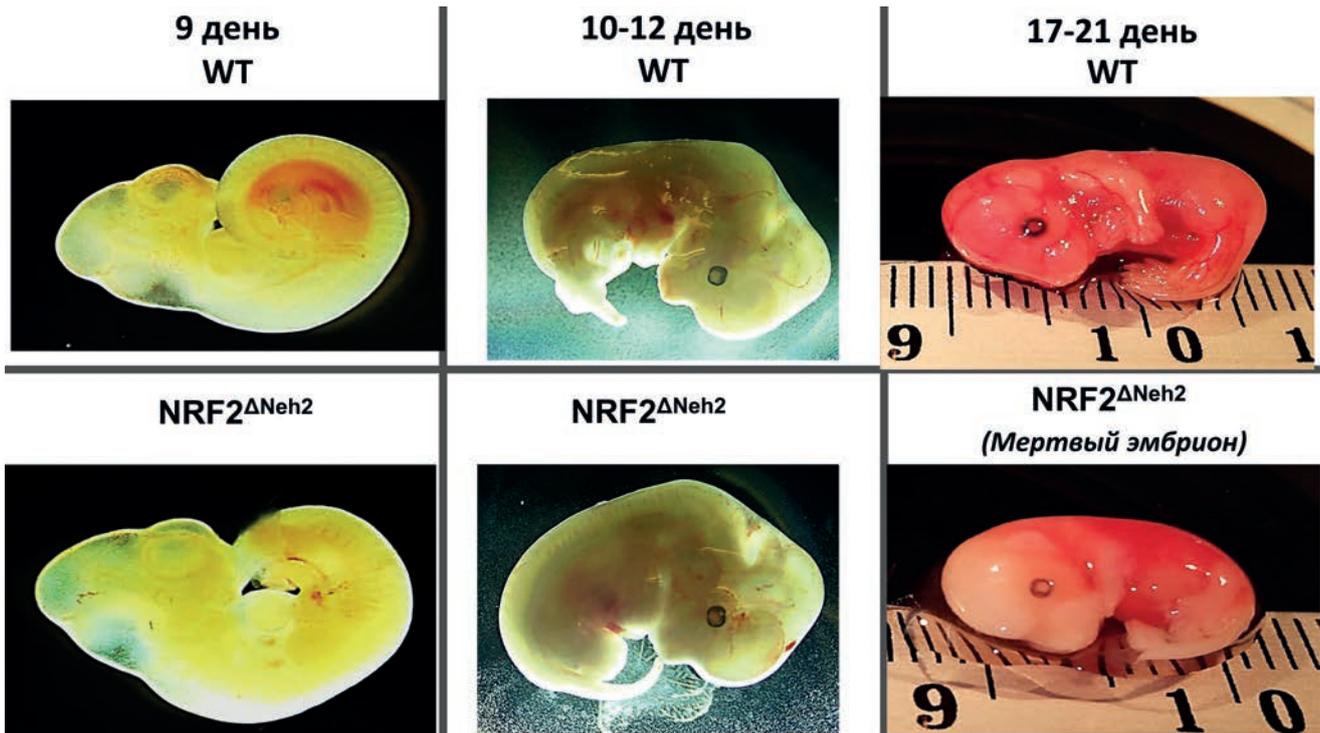


Рис. 2. Репрезентативные фотографии эмбрионов мышей дикого типа (WT) и гомозиготных мышей с мутацией в гене *Nfe2l2* ($\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$). При анализе эмбрионов, полученных при скрещивании гетерозигот на 9, 10–12 и 17–21 дни, у гомозигот $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$ наблюдаются признаки анемии

нии GOx выживаемость МЭФов, полученных от особей дикого типа, составила 50%, а клеток, полученных от гомозиготных мутантных особей, – 30%. Таким образом, МЭФы животных с мутацией в гене *Nrf2* оказались менее устойчивы к окислительному стрессу, индуцированному добавлением GOx, чем клетки дикого типа.

МЭФы гомозиготных $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}/\Delta\text{Neh2}}$ -мышей имеют пониженный уровень экспрессии мРНК *Nfe2l2* и его генов-мишеней. В МЭФах с мутацией в гене *Nfe2l2* гомозигот наблюдали тенденцию к снижению экспрессии *Nfe2l2* и его генов-мишеней, а также повышение количества мРНК маркера воспаления *Ccl2* (рис. 4, а). Интересно отметить, что при анализе одной и той же пробы мРНК и белка NRF2 в МЭФах количество мРНК *Nfe2l2* у $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$ -мышей было в ~10 раз меньше, чем у мышей дикого типа, а количество белка NRF2 практически не отличалось (рис. 4, б, в).

В тканях гомозиготных $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}/\Delta\text{Neh2}}$ -мышей снижен уровень мРНК *Nfe2l2* и некоторых его таргетных генов, а экспрессия маркеров воспаления *Ccl2*, *Vcam1* и *Cxcl8* повышена.

В печени гомозиготных мутантных особей наблюдали двукратное снижение экспрессии NRF2 и его мишени *Nqo1*, небольшое снижение экспрессии двух других мишеней NRF2 – *Aox1* и *Gsta4* (рис. 5, а). Также в печени мутантных

животных происходило двукратное увеличение количества мРНК гена *Ccl2* – одного из маркеров воспаления. В мозге гомозиготных мутантных животных наблюдали двукратное снижение экспрессии NRF2 и его гена-мишени *Aox1*, количество мРНК других генов почти не изме-

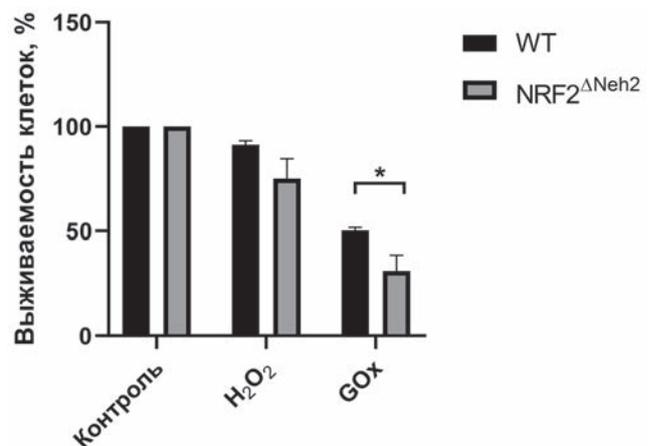


Рис. 3. МЭФы гомозиготных мутантных животных ($\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$) обладают большей чувствительностью к окислительному стрессу, индуцированному GOx, чем МЭФы животных дикого типа (WT). Гибель клеток была индуцирована перекисью водорода (250 мкМ) и GOx (3 ед./мл). Приведены результаты выживаемости фибробластов (резазуриновый тест). Указано среднее значение \pm SEM, $n = 3$. * $p < 0,05$ при сравнении с WT по непарному *t*-тесту Стьюдента

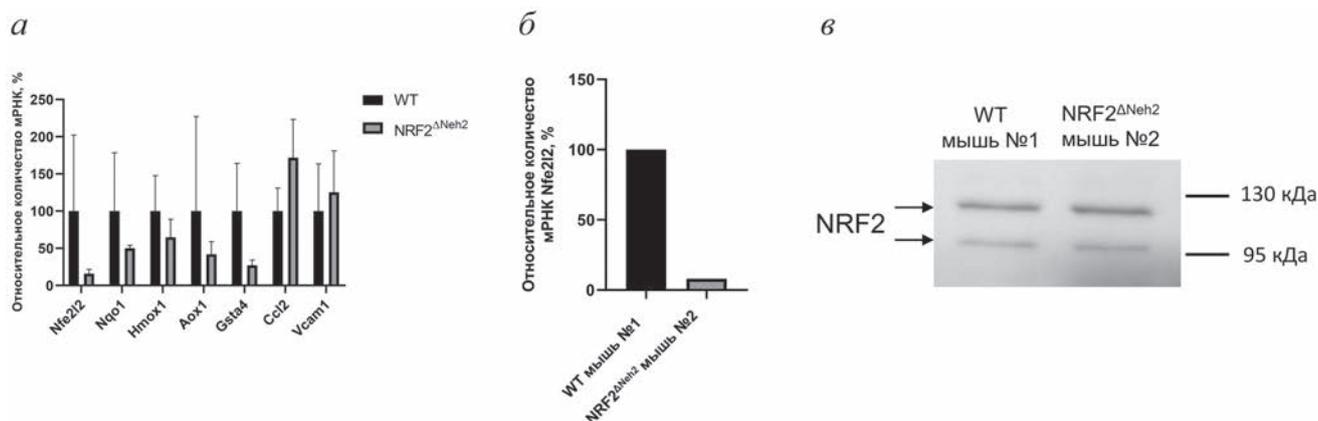


Рис. 4. Уровень экспрессии *Nfe2l2*, его генов-мишеней, а также генов-маркеров воспаления в МЭФах гомозигот $NRF2^{\Delta Neh2/\Delta Neh2}$ ($NRF2^{\Delta Neh2}$) и мышей дикого типа $NRF2^{wt/wt}$ (WT). *a* – Данные ПЦР в реальном времени, отражающие относительный уровень мРНК в МЭФах мышей дикого типа и гомозигот по мутации в *Nfe2l2*. Соответствующие гены: *Hmox1* – гемоксигеназа-1, мишень NRF2; *Nqo1* – NAD(P)Н:хинон оксидоредуктаза-1, мишень NRF2; *Aox1* – альдегидоксидаза-1, мишень NRF2; *Gsta4* – глутатион-S-трансфераза А4, мишень NRF2; *Ccl2* – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1; *Vcam1* – молекула адгезии 1 клеток сосудов. За 100% принят уровень мРНК для WT. Указано среднее значение \pm SEM, $n = 4$. *б* – Относительное количество мРНК *Nfe2l2* в МЭФах особи № 1 (WT) и МЭФах гомозиготы № 2 ($NRF2^{\Delta Neh2}$). *в* – Вестерн-блот с NRF2 в МЭФах особи № 1 (WT) и № 2 ($NRF2^{\Delta Neh2}$).

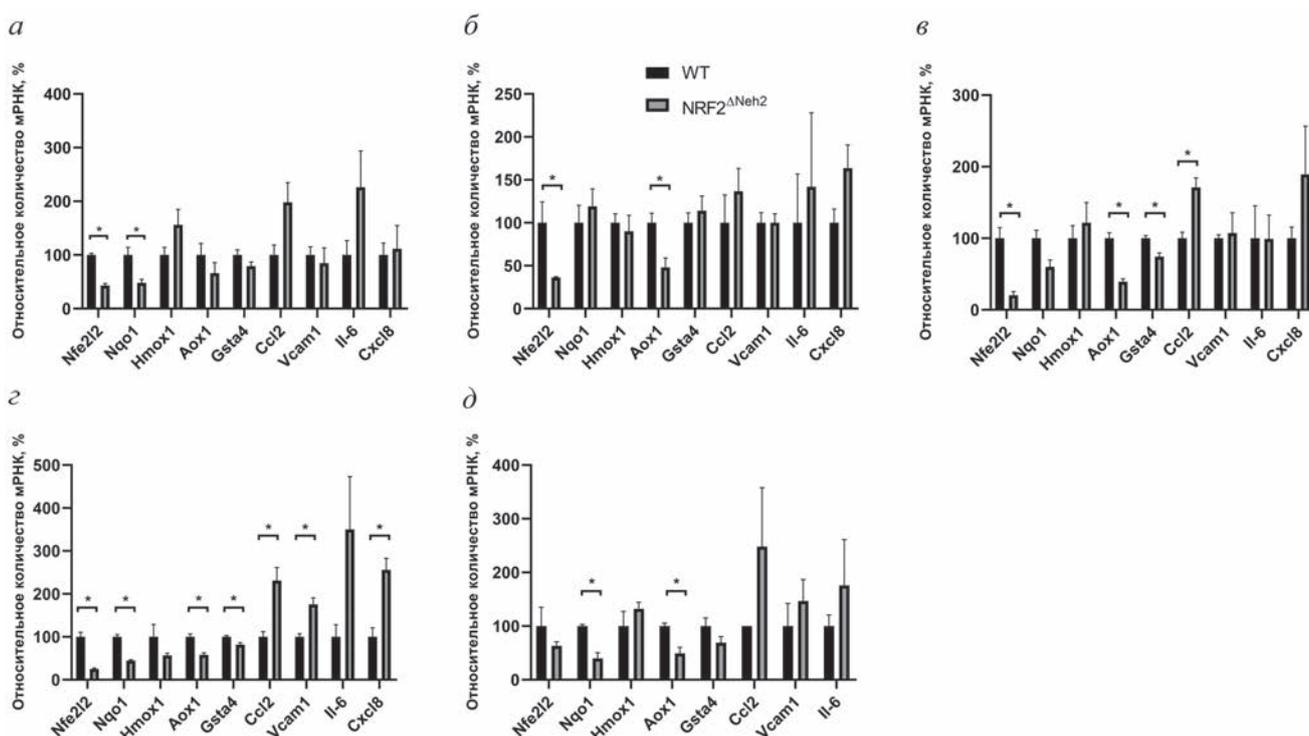


Рис. 5. Уровень экспрессии NRF2, его генов-мишеней, а также генов-маркеров воспаления в тканях животных дикого типа (WT) и гомозигот по мутации в *Nfe2l2* ($NRF2^{\Delta Neh2}$). Результаты ПЦР в реальном времени, отражающие относительное количество мРНК в печени (*a*), мозге (*б*), сердце (*в*), почке (*г*) и передней большеберцовой мышце (*мышца tibialis anterior*) (*д*) $NRF2^{\Delta Neh2}$ и WT. *Hmox1* – гемоксигеназа-1, мишень NRF2; *Nqo1* – NAD(P)Н:хинон оксидоредуктаза-1, мишень NRF2; *Aox1* – альдегидоксидаза-1, мишень NRF2; *Gsta4* – глутатион-S-трансфераза А4, мишень NRF2; *Ccl2* – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1; *Vcam1* – молекула адгезии 1 клеток сосудов; *Il-6* – интерлейкин 6; *Cxcl8* – интерлейкин 8, хемокин. За 100% принят уровень мРНК для WT. Указано среднее значение \pm SEM, $n = 3$. * $p < 0,05$ при сравнении с WT по непарному *t*-тесту Стьюдента

нялось (рис. 5, б). В сердце мышей, гомозиготных по мутации в *Nrf2*, наблюдали значительное снижение количества мРНК гена *Nfe2l2* и его мишени *Aox1* и небольшое снижение уров-

ня экспрессии *Nqo1* (рис. 5, в). Также в сердце $NRF2^{\Delta Neh2}$ -животных происходило небольшое увеличение уровня мРНК *Ccl2*. В почках $NRF2^{\Delta Neh2}$ -мышей происходило значительное

снижение уровня экспрессии *Nfe2l2*, *Nqo1* и *Aox1*, а также увеличение количества мРНК генов-маркеров воспаления *Ccl2*, *Vcam1* и *Cxcl8* (рис. 5, *з*). В передней большеберцовой мышце (*tibialis anterior*) гомозиготных по мутации *Nfe2l2* животных наблюдали уменьшение количества мРНК *Nfe2l2*, *Nqo1* и *Aox1*, небольшое снижение экспрессии *Gsta4* и увеличение количества мРНК маркера воспаления *Ccl2* (рис. 5, *д*). Удивительно, но ни в одной из исследованных тканей не происходило значимого изменения уровня экспрессии *Hmox1*. Измерение относительного уровня мРНК хемокина *Cxcl8* в большеберцовой мышце, а также мРНК цитокинов *Tnf* и *IL-1 β* во всех тканях оказалось невозможным в связи с высокими значениями пороговых циклов детекции ($Ct > 35$ циклов).

Таким образом, в тканях гомозиготных $NRF2^{\Delta Neh2/\Delta Neh2}$ -мышей происходит снижение уровня экспрессии как самого *Nfe2l2*, так и некоторых его мишеней, и одновременно увеличен уровень экспрессии некоторых маркеров воспаления.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данной работы были получены животные с мутацией в гене, кодирующем транскрипционный фактор NRF2 (рис. 1). Мутация затрагивает 8 аминокислотных остатков, находящихся в первом экзоне *N*-концевой части последовательности NRF2 в позициях 8–15, и включает в себя делецию аминокислот PPGLQSQQ с замещением их на аминокислоты RW. На *N*-концевой части NRF2 располагается домен *Neh2*, отвечающий за связывание NRF2 со своим негативным регулятором KEAP1, но аминокислотные остатки, находящиеся на позициях 1–15, обычно не включают в состав домена *Neh2*, так как они не являются консервативными среди белков, гомологичных NRF2 [27, 28]. Тем не менее в работе McMahon et al. [11] было показано, что делеция аминокислотных остатков 1–16 приводит к небольшому увеличению времени полужизни NRF2, причём этот эффект не связан с нарушением убиквитинирования белка. В данной работе было показано, что несмотря на то что введённая мутация затрагивает неконсервативный участок аминокислотной последовательности NRF2, она тем не менее оказывает влияние на функционирование белка, что проявляется в повышенной эмбриональной смертности мутантных животных, снижении устойчивости полученных от животных

МЭФов к окислительному стрессу, пониженном количестве мРНК *Nfe2l2* и некоторых его мишеней, а также повышенной экспрессии маркеров воспаления в МЭФах и некоторых органах гомозигот $NRF2^{\Delta Neh2/\Delta Neh2}$.

Известно, что понижение уровня NRF2 приводит к снижению устойчивости клеток и тканей к окислительному стрессу. Так, гипероксия вызывала более выраженные повреждения лёгких у нокаутных по *Nfe2l2* мышей по сравнению с мышами дикого типа [29]. У этих же животных под воздействием сигаретного дыма и дизельных выхлопов наблюдалось повышение уровня 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина, что свидетельствует об окислительном повреждении ДНК [30, 31]. Помимо этого, у нокаутных мышей при воздействии аллергенов, приводящих к воспалению дыхательных путей, наблюдается усиление окислительного повреждения [32], аналогичный эффект наблюдается и при сепсисе [33]. Ранее было показано, что МЭФы нокаутных по *Nfe2l2* мышей имеют повышенную чувствительность к окислительному стрессу, вызванному дикуват дибромидом [34], а также органическими и неорганическими перекисями [35]. В соответствии с вышеперечисленными наблюдениями, в нашей работе мы также наблюдали снижение выживаемости мутантных по *Nfe2l2* МЭФов (рис. 3).

Неожиданным результатом нашей работы явилось наблюдение, что мутация в *N*-концевой области NRF2 приводит к повышенной эмбриональной летальности (рис. 2). Часть гомозиготных эмбрионов имела признаки анемии, что может быть следствием нарушения производства эритроцитов, эритропоэза. Интересно отметить, что изучение транскрипционного фактора NRF2 началось благодаря открытию его роли в эритропоэзе, что отражено в его названии (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*): NRF2 был обнаружен как белок, узнающий промоторную область гена бета-глобина [36]. Однако у полученных нокаутных по NRF2 мышей не наблюдали каких-либо патологий, связанных с эритропоэзом, и также у них не наблюдалось анемии, эмбриональной летальности или снижения фертильности [17]. Можно предположить, что внесённая в NRF2 мутация могла повлиять на эритропоэз у гомозиготных мышей другим способом: например, нарушить способность NRF2 регулировать экспрессию генов, ответственных за биосинтез гемов — ключевых компонентов гемоглобина (см. обзор Kerins et al. [37]). Тем не менее точные причины и механизмы смерти эмбрионов остаются неизвестными.

В МЭФах гомозиготных мышей $NRF2^{\Delta Nch2}$ наблюдали снижение уровня мРНК *Nfe2l2*, а также снижение уровня мРНК большинства его мишеней (рис. 4, а). Такое снижение также наблюдалось в тканях гомозиготных животных (рис. 5), что свидетельствует о нарушении транскрипционной активности *NRF2* у этих мышей. Подобные изменения в профиле экспрессии генов были ранее описаны в различных тканях нокаутных по *Nfe2l2* мышей [38–41]. Интересно отметить, что несмотря на то что уровень мРНК *Nfe2l2* в МЭФах $NRF2^{\Delta Nch2}$ гомозигот был понижен по сравнению с диким типом, количество белка на Вестерн-блоте практически не отличалось (рис. 4, б, в). Вероятно, это может быть следствием увеличения времени жизни белка $NRF2^{\Delta Nch2}$, как было описано в работе McMahon et al. [11], однако это предположение требует дальнейшей проверки.

Известно, что под контролем *NRF2* находятся гены, продукты которых регулируют воспалительный ответ [42, 43]. Как правило, активация *NRF2* снижает воспалительный ответ в различных моделях *in vitro* и *in vivo*, в том числе путём уменьшения экспрессии генов хемокина *Ccl2* и молекулы межклеточной адгезии *Vcam1* [44]. В большинстве тканей $NRF2^{\Delta Nch2}$ -мышей наблюдался повышенный уровень экспрессии этих генов (рис. 5), что позволяет предположить, что полученная линия мышей может быть использована как модель с избыточной воспалительной активацией в разных тканях, в том числе почечных, поскольку именно в почках наблюдали наибольшие изменения в экспрессии этих генов (рис. 5, з).

Под контролем *NRF2* также находятся гены, регулирующие антиоксидантный ответ клетки: диафораза *Nqo1*, а также гены, кодирующие ключевые ферменты биосинтеза глутатиона: глутатион-трансферазы и глутаматцистеин-лигазы. Снижение уровня мРНК *Nqo1* и *Gsta4* наблюдалось во многих тканях

$NRF2^{\Delta Nch2}$ -мышей (рис. 5), что может свидетельствовать о нарушении редокс-гомеостаза и предполагает развитие окислительного стресса у данной линии животных, однако этот вопрос не исследовали в данной работе.

Таким образом, в нашей работе была получена новая мутантная линия мышей с заменой 8 аминокислот на *N*-концевом участке *NRF2*, что привело к частичному нарушению функций этого транскрипционного фактора и повышенной эмбриональной смертности. Полученная линия мышей может быть использована как модельный объект для изучения различных патологий развития, связанных с нарушением функций *NRF2*.

Вклад авторов. Е.С. Егоров – проведение экспериментов, написание текста; Н.Д. Кондратенко – проведение экспериментов, статистический анализ и подготовка рисунков (Е.С.Е. и Н.Д.К. внесли равнозначный вклад в работу); О.А. Аверина – работа с лабораторными животными, проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; О.А. Пермяков, М.А. Емельянова, А.С. Приходько – проведение экспериментов; Л.А. Зиновкина, П.В. Сергиев – проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; Р.А. Зиновкин – написание текста, концепция и руководство работами.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-64-00006.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ольге Юрьевне Плетюшкиной за неоценимую помощь в работе с МЭФаами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа с мышами была поддержана локальной комиссией по биоэтике ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», протокол № 79 от 28 апреля 2015 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 7130–7139, doi: 10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004.
2. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 221–229, doi: 10.1128/MCB.26.1.221-229.2006.
3. Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2004) Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6379–6384, doi: 10.1073/pnas.0305902101.

4. Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018) Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1727-1745, doi: 10.1089/ars.2017.7342.
5. Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., and Saso, L. (2020) An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation, *Molecules*, **25**, 5474, doi: 10.3390/molecules25225474.
6. Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2887-2900, doi: 10.1128/MCB.26.8.2887-2900.2006.
7. Zhang, D. D., Lo, S.-C., Cross, J. V., Templeton, D. J., and Hannink, M. (2004) Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10941-10953, doi: 10.1128/MCB.24.24.10941-10953.2004.
8. Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., and Yamamoto, M. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription, *Genes Cells*, **6**, 857-868, doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00469.x.
9. Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., et al. (2013) RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2, *Cancer Res.*, **73**, 3097-3108, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3386.
10. Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., and Cuadrado, A. (2011) SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 1121-1133, doi: 10.1128/MCB.01204-10.
11. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron, *J. Biol. Chem.*, **279**, 31556-31567, doi: 10.1074/jbc.M403061200.
12. Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J., and Pickett, C. B. (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10895-10906, doi: 10.1128/MCB.25.24.10895-10906.2005.
13. Karunatilleke, N. C., Fast, C. S., Ngo, V., Brickenden, A., Duennwald, M. L., Konermann, L., et al. (2021) Nrf2, the major regulator of the cellular oxidative stress response, is partially disordered, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7434, doi: 10.3390/ijms22147434.
14. Kansanen, E., Jyrkkänen, H.-K., and Levonen, A.-L. (2012) Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 973-982, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038.
15. Reddy, N. M., Potteti, H. R., Mariani, T. J., Biswal, S., and Reddy, S. P. (2011) Conditional deletion of Nrf2 in airway epithelium exacerbates acute lung injury and impairs the resolution of inflammation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **45**, 1161-1168, doi: 10.1165/rcmb.2011-0144OC.
16. Rushworth, S. A., Shah, S., and MacEwan, D. J. (2011) TNF mediates the sustained activation of Nrf2 in human monocytes, *J. Immunol.*, **187**, 702-707, doi: 10.4049/jimmunol.1004117.
17. Lu, X.-Y., Wang, H.-D., Xu, J.-G., Ding, K., and Li, T. (2015) Deletion of Nrf2 exacerbates oxidative stress after traumatic brain injury in mice, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **35**, 713-721, doi: 10.1007/s10571-015-0167-9.
18. Chan, K., Lu, R., Chang, J. C., and Kan, Y. W. (1996) NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13943-13948, doi: 10.1073/pnas.93.24.13943.
19. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, **8**, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
20. Cho, A., Haruyama, N., and Kulkarni, A. B. (2009) Generation of transgenic mice, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **42**, 19.11.1-19.11.22, doi: 10.1002/0471143030.cb1911s42.
21. Averina, O. A., Vysokikh, M. Y., Permyakov, O. A., and Sergiev, P. V. (2020) Simple recommendations for improving efficiency in generating genome-edited mice, *Acta Naturae*, **12**, 42-50, doi: 10.32607/actanaturae.10937.
22. Bonaparte, D., Cinelli, P., Douni, E., Héroult, Y., Maas, M., Pakarinen, P., et al. (2013) FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group, *Lab. Anim.*, **47**, 134-145, doi: 10.1177/0023677212473918.
23. Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., and Warman, M. L. (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT), *Biotechniques*, **29**, 52-54, doi: 10.2144/00291bm09.
24. Qiu, L.-Q., Lai, W. S., Stumpo, D. J., and Blackshear, P. J. (2016) Mouse embryonic fibroblast cell culture and stimulation, *Bio Protoc.*, **6**, e1859, doi: 10.21769/BioProtoc.1859.
25. Zinovkina, L. A., Galivondzhyan, M. K., Prikhodko, A. S., Galkin, I. I., and Zinovkin, R. A. (2020) Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds do not affect estrogen receptor alpha, *PeerJ*, **8**, e8803, doi: 10.7717/peerj.8803.
26. Zinovkin, R. A., Romaschenko, V. P., Galkin, I. I., Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Chernyak, B. V., and Popova, E. N. (2014) Role of mitochondrial

- reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium, *Aging*, **6**, 661-674, doi: 10.18632/aging.100685.
27. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev.*, **13**, 76-86, doi: 10.1101/gad.13.1.76.
 28. Katoh, Y., Iida, K., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K. I., McMahon, M., Hayes, J. D., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2005) Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome, *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 342-350, doi: 10.1016/j.abb.2004.10.012.
 29. Cho, H.-Y., Jedlicka, A. E., Reddy, S. P. M., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Zhang, L.-Y., and Kleeberger, S. R. (2002) Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **26**, 175-182, doi: 10.1165/ajrcmb.26.2.4501.
 30. Rangasamy, T., Cho, C. Y., Thimmulappa, R. K., Zhen, L., Srisuma, S. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Petrache, I., Tuder, R. M., and Biswal, S. (2004) Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice, *J. Clin. Invest.*, **114**, 1248-1259, doi: 10.1172/jci200421146.
 31. Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2001) Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **173**, 154-160, doi: 10.1006/taap.2001.9176.
 32. Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W. A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A. D., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Tuder, R. M., Georas, S. N., and Biswal, S. (2005) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice, *J. Exp. Med.*, **202**, 47-59, doi: 10.1084/jem.20050538.
 33. Thimmulappa, R. K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S. P., Yamamoto, M., Kensler, T. W., et al. (2016) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis, *J. Clin. Invest.*, **116**, 984-995, doi: 10.1172/JCI25790.
 34. Osburn, W. O., Wakabayashi, N., Misra, V., Nilles, T., Biswal, S., Trush, M. A., et al. (2006) Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion, *Arch. Biochem. Biophys.*, **454**, 7-15, doi: 10.1016/j.abb.2006.08.005.
 35. Higgins, L. G., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2009) Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts *in vitro* against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**, 267-280, doi: 10.1016/j.taap.2009.03.005.
 36. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y. W. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9926-9930, doi: 10.1073/pnas.91.21.9926.
 37. Kerins, M. J., and Ooi, A. (2018) The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1756-1773, doi: 10.1089/ars.2017.7176.
 38. Gebel, S., Diehl, S., Pype, J., Friedrichs, B., Weiler, H., Schüller, J., Xu, H., Taguchi, K., Yamamoto, M., and Müller, T. (2010) The transcriptome of Nrf2^{-/-} mice provides evidence for impaired cell cycle progression in the development of cigarette smoke-induced emphysematous changes, *Toxicol. Sci.*, **115**, 238-252, doi: 10.1093/toxsci/kfq039.
 39. Muramatsu, H., Katsuoka, F., Toide, K., Shimizu, Y., Furusako, S., and Yamamoto, M. (2013) Nrf2 deficiency leads to behavioral, neurochemical and transcriptional changes in mice, *Genes Cells*, **18**, 899-908, doi: 10.1111/gtc.12083.
 40. Chartoumpakis, D. V., Ziros, P. G., Zaravinos, A., Iskrenova, R. P., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., Sykiotis, G. P., and Habeos, I. G. (2013) Hepatic gene expression profiling in Nrf2 knockout mice after long-term high-fat diet-induced obesity, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2013**, 340731, doi: 10.1155/2013/340731.
 41. Quiles, J. M., Narasimhan, M., Shanmugam, G., Milash, B., Hoidal, J. R., and Rajasekaran, N. S. (2017) Differential regulation of miRNA and mRNA expression in the myocardium of Nrf2 knockout mice, *BMC Genomics*, **18**, 509, doi: 10.1186/s12864-017-3875-3.
 42. Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017) Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 585-597, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
 43. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/S0006297920070111.
 44. Chen, X.-L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H., and Kunsch, C. (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H1862-H1870, doi: 10.1152/ajpheart.00651.2005.

A NEW MOUSE STRAIN WITH MUTATION IN THE *NFE2L2* (*NRF2*) GENE

E. S. Egorov¹, N. D. Kondratenko^{2,3}, O. A. Averina^{2,4,5}, O. A. Permyakov^{4,5},
M. A. Emelyanova^{4,5}, A. S. Prikhodko^{1,2}, L. A. Zinovkina¹,
P. V. Sergiev^{2,4,5}, and R. A. Zinovkin^{2,6*}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: roman.zinovkin@gmail.com

³ Russian Clinical Research Center for Gerontology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Pirogov Russian National Research Medical University, 129226 Moscow, Russia

⁴ Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁵ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁶ HSE University, 101000 Moscow, Russia

The transcription factor NRF2 is involved in inflammatory reactions, maintenance of redox balance, metabolism of xenobiotics, and is of particular interest for aging studies. In the present work, CRISPR/Cas9 genome editing technology was used to generate NRF2^{ΔNeh2} mice containing a substitution of eight amino acid residues at the N-terminus of the NRF2 protein, upstream of the functional Neh2 domain, which ensures binding of NRF2 to its inhibitor KEAP1. Heterozygote NRF2^{wt/ΔNeh2} mice gave birth to homozygous mice with lower than expected frequency, accompanied by their increased embryonic lethality and visual signs of anemia. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} homozygotes showed impaired resistance to oxidative stress compared to wild-type MEFs. The tissues of homozygous NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} animals had a decreased expression of NRF2 target genes: NAD(P)H: Quinone oxidoreductase-1 (*Nqo1*); aldehyde oxidase-1 (*Aox1*); glutathione-S-transferase A4 (*Gsta4*); while the relative mRNA level of monocyte chemoattractant protein 1 (*Ccl2*), vascular cell adhesion molecule 1 (*Vcam1*) and chemokine *Cxcl8* was increased. Thus, the resulting mutation in the *Nfe2l2* gene partially impaired the function of this transcription factor, expanding the insights into the functional role of the unstructured N-terminus of NRF2. The obtained NRF2^{ΔNeh2} mouse line can be used as a model object for studying various pathologies associated with oxidative stress and inflammation.

Keywords: transcription factor NRF2, transgenic animals, inflammation, oxidative stress

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ ДРОЖЖЕЙ

Обзор

© 2023 А.В. Азбарова^{1,2}, Д.А. Кнорре^{1*}

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

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.08.2023

После доработки 13.11.2023

Принята к публикации 15.11.2023

Несмотря на многообразие проявлений старения, в его основе лежат общие закономерности. В частности, у многоклеточных животных и грибов одной из наиболее уязвимых для возрастных изменений систем являются митохондрии. В обзоре рассмотрено, как дисфункция митохондрий взаимосвязана с репликативным старением простейшей эукариотической модели – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Обсуждается цепь событий, которая начинается с асимметричного распределения митохондрий между материнской и дочерней клетками, снижения трансмембранного потенциала митохондрий и скорости импорта митохондриальных белков в стареющих клетках. Это приводит к накоплению предшественников митохондриальных белков в цитоплазме, потере митохондриальной ДНК и в конечном счете к гибели клетки. Интересно, что при этом штаммы дрожжей, исходно лишённые митохондриальной ДНК, могут обладать как повышенной, так и сниженной продолжительностью жизни. Это зависит от того, как у них устроены системы активации ответа на митохондриальную дисфункцию. Ключевая роль митохондрий в развитии процессов, приводящих к старению и гибели дрожжей, показывает, что они являются одной из наиболее сложных, и потому уязвимой к накоплению ошибок, системой эукариотической клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дрожжи, программа развития, старение, митохондриальная ДНК, дисфункция митохондрий.

DOI: 10.31857/S0320972523120047, **EDN:** NJQFMZ

ВВЕДЕНИЕ

Старение – процесс снижения фертильности и увеличения вероятности смерти с возрастом [1] – неизбежно возникает в живых системах в процессе эволюции. Это связано с тем, что естественный отбор становится менее эффективным после размножения, поскольку он действует на признаки и гены, которые влияют на размножение и потомство. Соответственно, по мере того как организм производит все больше потомков, действие естественного отбора на те признаки (и определяющие их гены), которые проявляются уже после размножения, ослабевает [2, 3]. Микроорганизмы, в том числе бактерии и одноклеточные

грибы, не являются исключением. У тех видов бактерий и дрожжей, у которых деление происходит асимметрично, то есть клетка делится с образованием материнской и дочерней клетки, которые различаются по размеру, обычно наблюдается старение [4–7].

Наиболее детально изученным одноклеточным организмом, у которого обнаружено старение, являются пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [8–10]. Исследование механизмов старения дрожжей расширило знания о фундаментальных закономерностях старения, а также привело к идентификации систем, воздействие на которые приводит к увеличению продолжительности жизни. Преимуществами пекарских дрожжей как модельного

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК; РПЖ – репликативная продолжительность жизни.

* Адресат для корреспонденции.

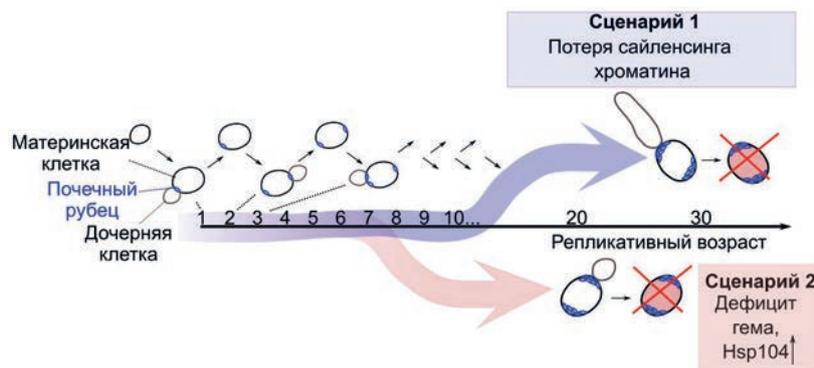


Рис. 1. Два сценария репликативного старения дрожжей. Репликативный возраст указан приблизительно – на основании работ, процитированных в тексте

объекта являются высокая скорость пролиферации и возможность получения генетически стабильных линий мутантных штаммов, что позволяет устанавливать функции генов и кодируемых ими белков [11]. В настоящее время доступны десятки коллекций мутантных штаммов дрожжей, с их помощью проведены генетические скрининги, направленные на идентификацию генов, связанных с долголетием [12, 13]. Так, например, с помощью дрожжевой модели старения были открыты миметики ограничения калорийности питания, в том числе ресвератрол [14], эффект которых наблюдается и на животных [15]. Скрининг мутаций, меняющих продолжительность жизни *S. cerevisiae*, выявил 238 генов, делеция которых увеличивает продолжительность жизни дрожжей [16]. Многие из этих генов аналогичным образом влияли на продолжительность жизни нематод *Caenorhabditis elegans* [16]. Результаты данного скрининга были обогащены генами, кодирующими ферменты цикла трикарбоновых кислот, генами, необходимыми для трансляции белков в митохондриях, а также генами, кодирующими белковые компоненты митохондриальной рибосомы [16]. В другой работе авторы показали, что делеция генов, связанных со старением у нематод, чаще приводит к увеличению продолжительности жизни дрожжей, чем к ее снижению [17]. Поэтому можно говорить о консервативности механизмов старения у эукариот.

Старение пекарских дрожжей *S. cerevisiae* обычно определяют как увеличение вероятности гибели материнской клетки не со временем, а с количеством образованных дочерних клеток – почек. Поэтому по отношению к клеткам дрожжей часто используется термин «репликативное» старение [18] (рис. 1).

Количество дочерних клеток, которое может образовать отдельно взятая материнская

клетка дрожжей, ограничено и обычно находится в диапазоне 15–25 [19]. Количество дочерних клеток, которые может образовать материнская клетка до того, как погибнет, называют репликативной продолжительностью жизни (РПЖ). При этом первые изменения внутри клетки, например изменения экспрессии генов стрессорного ответа, происходят уже при образовании первых нескольких почек [20].

В процессе старения дрожжей происходит дерегуляция экспрессии многих генов и биогенеза белков. Это приводит к тому, что с возрастом соотношение субъединиц в сложных белковых комплексах, таких, например, как вакуолярная АТРаза, отклоняется от оптимального [21]. В последние годы методы микрофлюидики открыли возможность следить за ходом репликативного старения в отдельно взятых клетках [22, 23]. Оказалось, что траектория старения каждой индивидуальной клетки предопределяется в течение первых нескольких клеточных циклов, а затем идет по одному из двух сценариев. Оба сценария в конечном счете приводят к гибели клеток, однако причины потери жизнеспособности различаются для каждого из этих двух сценариев [24].

Первый сценарий связан с постепенной потерей сайленсинга хроматина (подавление экспрессии генов на уровне транскрипции), что характеризуется повышенной экспрессией *rDNA-GFP* (ген *GFP* интегрирован в нетранскрибируемый участок между генами, кодирующими рибосомальные РНК). Продолжительность клеточного цикла материнских клеток, стареющих таким способом, остается относительно постоянной в течение всей жизни. Последние несколько клеточных циклов сопряжены с формированием удлинённых дочерних клеток (рис. 1).

Старение по второму сценарию сопряжено с увеличением продолжительности клеточного

цикла на ранних этапах жизни и формированием округлых почек [25]. В клетках дрожжей, состарившихся по второму сценарию, наблюдается дефицит гема [25]. Поскольку последние этапы синтеза гема происходят в митохондриях, а дефицит гема вызывает нарушение работы митохондрий [26], можно предположить, что старение по второму сценарию связано с нарушением функции митохондрий. Смерть клеток, стареющих по второму сценарию, характеризуется исчезновением сигнала от Leu4-GFP – митохондриально локализованного белка, участвующего в биосинтезе лейцина (2-изопропилмалат синтаза). Поскольку Leu4p принимает участие в биосинтезе лейцина, содержание Leu4p в клетках предполагает возникновение проблем с анаболизмом лейцина в состарившихся клетках. Кроме того, при старении по второму сценарию наблюдается увеличение экспрессии *HSP104* – гена, кодирующего цитоплазматический шаперон Hsp104p [27]. Одной из функций Hsp104p является связывание и временное хранение предшественников митохондриальных белков в цитоплазме [28], а увеличение концентрации Hsp104p в цитоплазме, как правило, ассоциировано с накоплением денатурированных белков [29]. На основе информации об описанных выше сценариях был придуман генетический осциллятор, заставляющий клетки дрожжей колебаться между этими двумя траекториями старения, что позволило увеличить продолжительность их жизни на 82% [30].

Таким образом, репликативное старение дрожжей можно рассматривать как детерминированную программу развития, идущую по одному из как минимум двух возможных сценариев (рис. 1). При этом, как обсуждалось выше, некоторые клеточные системы лимитируют продолжительность жизни дрожжей и в то же время влияют на долголетие многоклеточных животных [17]. Один из двух описанных сценариев старения, по всей видимости, сопряжен с нарушением работы митохондрий. В этом обзоре мы обсуждаем возможные причинно-следственные связи старения и митохондриальной дисфункции у дрожжей.

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ

Клетки пекарских дрожжей делятся асимметрично: материнская и дочерняя клетки значительно отличаются по размеру и по содержанию некоторых белков [31]. Асимметрия по содержанию белков достигается диффузион-

ными ограничениями, накладываемыми на транспорт между клетками крупных клеточных структур: больших белковых агрегатов и органелл, в которых заключены эти белки [32]. Кроме того, агрегаты белков и некоторые клеточные органеллы активно транспортируются между клетками, а также могут заякориваться в кортикальном слое цитоплазмы материнской или дочерних клеток [33, 34]. Транспорт митохондрий между материнской и дочерней клеткой у пекарских дрожжей осуществляется с помощью актинового цитоскелета и миозина Myo2p [35], который связывает митохондрии за белок Mmr1p, локализованный в их внешней мембране [36]. Одновременно с этим белки Num1p и Mfb1p удерживают часть митохондрий на полюсе материнской клетки [37, 38]. Транспорт и селективное удержание митохондрий позволяет распределить их между материнской и дочерней клетками таким образом, чтобы в дочерней клетке оказались наиболее функциональные митохондрии, но при этом и в материнской клетке, наряду с поврежденными митохондриями, осталось небольшое количество функциональных митохондрий [39].

Асимметричное распределение митохондрий между материнской и дочерней клетками приводит к тому, что в материнской клетке остаются митохондрии с более окисленным состоянием молекул матрикса, чем у митохондрий, доставленных в дочернюю клетку. Окислительно-восстановительный баланс в матриксе митохондрий выявляют по изменению флуоресценции редокс-чувствительных флуоресцентных белков, адресованных в матрикс митохондрий [40, 41]. При наличии внутриклеточной гетерогенности митохондрий в клетке дочерняя клетка скорее получит функциональную митохондрию, а нефункциональные митохондрии останутся в материнской клетке [39]. Однако до сих пор неясно, на каком принципе построена селективность заякоривания и транспорта митохондрий между клетками.

Последовательные раунды асимметричных делений приводят к тому, что за несколько делений в материнской клетке начинают проявляться нарушения работы митохондрий. В частности, в течение первых десяти делений происходит снижение трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi$) [42], а митохондриальная сеть фрагментируется на отдельные органеллы [42, 43]. Известно, что вызванное добавлением протонофоров снижение трансмембранного потенциала митохондрий приводит к дроблению митохондриальной сети [44]. Более того, окислительный стресс, вызванный добавлением прооксидантов, также способен

вызывать фрагментацию митохондрий [45, 46]. Поэтому можно было бы предположить, что дробление митохондрий – это всего лишь сопутствующее событие, сопровождающее увеличение уровня окислительного стресса и деполяризации митохондрий с возрастом. Однако, как было показано, делеция гена *DNM1*, который кодирует динаминподобный белок Dnm1p, необходимый для деления митохондрий, значительно увеличивала РПЖ дрожжей [47]. Таким образом, фрагментация митохондрий является одной из причин деструктивных процессов, развивающихся с возрастом клетки, а не просто сопутствующим событием.

Возраст-зависимое снижение трансмембранного потенциала митохондрий приводит к снижению эффективности импорта белков из цитоплазмы в митохондрии [48]. Импорт белков через наружную мембрану не зависит от трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий, в то время как транслокация белков через внутреннюю мембрану прекращается при рассеивании $\Delta\Psi$ протонофорами [48].

Подавление белкового импорта в митохондрии имеет два неблагоприятных для клетки следствия: во-первых, в матриксе возникает дефицит белков, необходимых для репликации митохондриальной ДНК (мтДНК), а также транскрипции и трансляции закодированных там генов. В частности, происходит снижение содержания Mip1p, митохондриальной ДНК-полимеразы, без которой репликация мтДНК невозможна [49]. Интересно, что повышенная экспрессия гена *ТОМ70*, который кодирует компонент ТОМ-комплекса (транслоказа внешней мембраны митохондрий), может частично компенсировать этот эффект за счет активации белкового импорта [49]. Это также указывает на то, что нарушение белкового импорта является одной из причин репликативного старения дрожжей. В конечном счете эти процессы приводят к потере мтДНК в репликативно старых клетках [50] (рис. 1).

Во-вторых, ингибирование импорта белков в митохондрии приводит к накоплению их предшественников в цитоплазме. Такие предшественники токсичны для клетки: известно, что экспрессия белков «клоггеров», запирающих митохондриальную систему импорта белков, останавливает рост клеток [28]. Более того, несмотря на то что клетки дрожжей могут жить за счет гликолиза без мтДНК и окислительного фосфорилирования, делеция большинства генов комплекса TIM (транслоказа внутренней мембраны митохондрий)

или ТОМ-комплекса – летальна [51]. Вероятно, в совокупности, два этих неблагоприятных явления – снижение концентрации жизненно важных белков в митохондриях и протеотоксический стресс, вызванный предшественниками митохондриальных белков, приводят к увеличению длительности клеточного цикла и в конечном счете к гибели клеток. На данный момент нет возможности достоверно различить вклад митохондрий в старение по первому и второму сценариям, описанным выше. Однако именно в случае второго сценария наблюдается изменение структуры митохондриальной сети в процессе старения [25], а также снижение способности клеток накапливать в своих митохондриях флуоресцентный липофильный катион DiOC6 [27]. Это указывает на то, что дисфункция митохондрий, скорее, характерна для второго сценария.

ПОТЕРЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК РАЗНОНАПРАВЛЕННО ВЛИЯЕТ НА РЕПЛИКАТИВНУЮ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ДРОЖЖЕЙ

Митохондрия – это полуавтономная клеточная органелла; у большинства видов эукариот она сохранила собственную ДНК, в которой закодированы компоненты систем трансляции, а также некоторые ключевые белки дыхательной цепи [52]. Поэтому мутации в мтДНК или ее полное исчезновение (обычно обозначается как *rho⁰*) приводит к потере митохондриями возможности выполнять функцию, связанную с преобразованием энергии.

Клетки некоторых стандартных лабораторных штаммов дрожжей, которые были лишены мтДНК (например – *YPK9 rho⁰*), демонстрируют увеличенную репликативную продолжительность жизни по сравнению с родительскими штаммами *rho⁺* [53–57]. Однако эффект от удаления мтДНК обратный [58] или отсутствует в других штаммах, в том числе в *W303-1A*, широко используемом для исследования митохондриальной энергетики дрожжей [53], и в *BY4742* – штамме, на котором основаны современные коллекции мутантных штаммов [59, 60]. Различия в эффектах, по всей видимости, связаны с тем, что клетки разных штаммов по-разному отвечают на митохондриальную дисфункцию [53]. Потеря мтДНК клетками дрожжей вызывает значительные изменения в экспрессии генов и содержании белков у всех исследованных штаммов [61–63]. В том числе

происходит активация ретроградного сигнального пути, приводящего к активации генов, кодирующих ферменты гликолиза и глиоксилатного цикла [61, 64]. Это позволяет клеткам адаптировать собственный метаболизм к условиям, когда невозможно окислительное фосфорилирование, и реакции, сопряженные с дыханием (например, окисление сукцината), – заблокированы.

Причина разнонаправленного изменения РПЖ дрожжей разных штаммов при потере мтДНК может быть связана с несколькими факторами. Так, лабораторный штамм *W303-1A* при потере мтДНК не активирует экспрессию гена *CIT2*, кодирующего пероксисомальную цитрат-синтазу [65], а штамм *YPK9*, клетки *rho⁰* которого обладают увеличенной продолжительностью жизни, – увеличивает экспрессию этого гена [53]. Кроме того, разные штаммы могут значительно отличаться по длине тандемного повтора участка генов рРНК, расположенного на хромосоме XII [66]. Длина этого повтора в геноме положительно коррелирует со средней РПЖ клеток штамма [67]. Это связано с работой механизма отрицательной обратной связи, регулирующей работу гена *SIR2*, который кодирует деацетилазу гистонов Sir2p. Sir2p ингибирует образование кольцевых рибосомальных ДНК (рДНК), являющихся одной из причин старения дрожжей. Регуляторные факторы, связывающиеся с тандемным повтором генов рРНК, количество которых отрицательно коррелирует с длиной тандемного повтора участка генов рРНК, ингибируют Sir2p. Это приводит к появлению кольцевых рДНК в клетках с коротким тандемным повтором. Такие кольцевые рДНК накапливаются в старых клетках, нарушают сайленсинг хроматина и увеличивают вероятность их гибели с возрастом [67]. Можно предположить, что в штаммах дрожжей с коротким тандемным повтором РПЖ лимитируется активностью *SIR2*, накоплением рДНК и старением по первому сценарию, и поэтому функциональное состояние митохондрий не играет особой роли. В то же время в штаммах дрожжей, в которых тандемный повтор рРНК относительно длинный, старение идет преимущественно по второму сценарию, и митохондриальная дисфункция ускоряет скорость старения.

Разный ответ штаммов на деплецию мтДНК может быть также связан с тем, что процесс адаптации к потере мтДНК происходит медленно и занимает несколько десятков поколений [68]. При этом неадаптированные клетки *rho⁰* обладают сниженной, а адаптированные – повышенной продолжительностью

жизни по сравнению с родительским штаммом [68]. Можно предположить, что процесс адаптации происходит с разной скоростью и протекает разными путями у разных лабораторных штаммов.

Наконец, можно предположить, что потеря мтДНК в разной степени влияет на старение по двум сценариям, описанным выше, например, заранее делает клетки адаптированными для старения по второму сценарию, связанному с нарушением работы митохондрий. В этом случае различия лабораторных штаммов по тому, в каком соотношении реализуются эти два сценария при старении, также может объяснять неоднозначность последствий потери клетками мтДНК.

РОЛЬ ЯДЕРНЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ, В РЕПЛИКАТИВНОМ ДОЛГОЛЕТИИ ДРОЖЖЕЙ

Митохондриальный протеом дрожжей (совокупность разных белков митохондрий) составляет ~900 белков, подавляющее большинство которых закодированы в ядре и импортируются в митохондрии из цитоплазмы [69]. Соответственно, дисфункция митохондрий может быть вызвана не только потерей мтДНК, но происходит и при выключении ядерных генов, которые кодируют митохондриальные белки. Полногеномное секвенирование коллекции делеционных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* показало, что делеция 129 из приблизительно 5000 генов, делеция которых не приводит к потере клетками жизнеспособности, вызывает утрату мтДНК [70]. Показательно, что часть этих генов (17) также была выявлена в скрининге, направленном на поиск генов, делеция которых приводит к увеличению репликативной продолжительности жизни дрожжей [16]. Такое пересечение с большой долей вероятности неслучайно и указывает на связь этих явлений (рис. 2).

В то же время эти результаты показывают, что далеко не все делеции, которые вызывают потерю мтДНК, приводят к долголетию. Среди генов, кодирующих митохондриальные белки, делеция которых увеличивает РПЖ дрожжей, явно выделяется одна категория – это гены, кодирующие компоненты митохондриальной рибосомы. Из диаграммы Венна на рис. 2 видно, что делеция генов *MRPL33*, *MRPL40*, *MRPL49*, *IMG1*, *IMG2*, кодирующих рибосомальные белки, приводит к увеличению РПЖ. Было показано, что делеция гена *MRPL25*, кодирующего

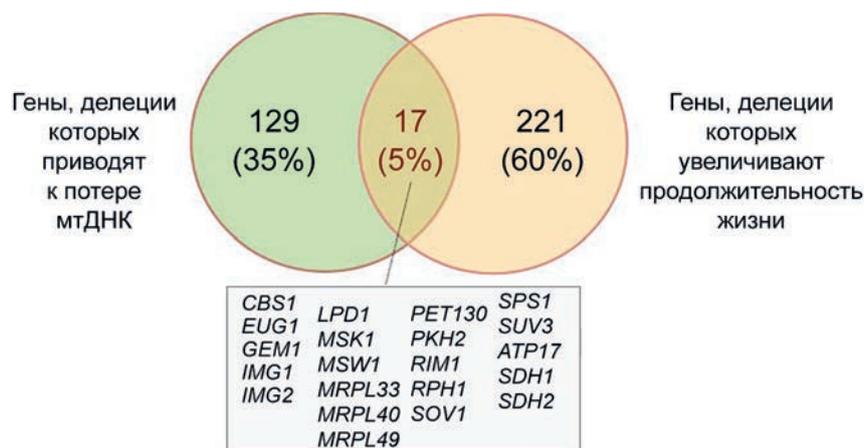


Рис. 2. Диаграмма Венна иллюстрирует пересечение выборок генов дрожжей *S. cerevisiae*, делеция которых приводит к потере мтДНК (работа Puddu et al. [70]) и делеция которых приводит к увеличению репликативной продолжительности жизни (работа McCormick et al. [16]). Вероятность случайного пересечения таких выборок 17 или более генами составляет менее 0,1%

еще один рибосомальный белок, делает клетки устойчивыми к прооксидантам и увеличивает максимальную РПЖ до 60 клеточных делений вместо ~40 – у контрольного штамма [71]. Кроме того, делеция гена *SOV1*, необходимого для сборки митохондриальных рибосом, также увеличивает РПЖ дрожжей [72]. На данный момент остается неизвестным, что делают особенными гены, кодирующие именно митохондриальные рибосомальные белки. Стоит отметить, что функциональная митохондриальная рибосома не имеет возможности сформироваться вне зависимости от того, что послужило причиной потери мтДНК, так как в мтДНК закодированы субъединицы митохондриальной рибосомы рРНК [73]. Однако механизм импорта белков митохондриальной рибосомы несколько отличается от импорта остальных белков. Некоторые из них лишены выраженной митохондриальной адресной последовательности, что связано с консервативностью их функции, в том числе и *N*-концевого участка белков [74]. Следовательно, можно предположить, что делеция этих генов может менять нагрузку на систему импорта белков в митохондрии *rho*⁰ иначе (например, освобождая другие вспомогательные белки), чем делеция остальных, закодированных в ядре генов с выраженным *N*-концевым митохондриальным адресом. Другая возможность связана с тем, что при отсутствии рРНК в митохондриальном матриксе данные белки могут проявлять токсичность и тем самым ускорять старение материнских клеток дрожжей. Наконец, в работе Caballero et al. [72] было высказано предположение, что при исчезновении одних компонентов организации митохондриальной трансляции оставшиеся компоненты той же

системы могут приобретать дополнительные сигнальные функции, связанные с сайленсингом хроматина, приводящие к увеличению долголетия. Это предположение согласуется с наблюдением: для того чтобы делеция гена *CBS1*, кодирующего митохондриальный активатор трансляции, приводила к увеличению РПЖ, необходим белок Cbs2p, который локализуется одновременно и в митохондрии, и в ядре [72].

В то время как делеция одних генов, кодирующих митохондриальные белки, увеличивает РПЖ, делеция других генов приводит к ее заметному сокращению. Делеция гена *MIP1*, который кодирует митохондриальную ДНК-полимеразу и без которого репликация мтДНК невозможна, приводит к укорочению РПЖ [72]. Снижение продолжительности жизни также наблюдается при делеции генов *COX4*, *COX7* [72, 75], *CYC3* [76]. Эти гены кодируют субъединицы комплекса IV дыхательной цепи; их делеция делает невозможным окислительное фосфорилирование и, соответственно, утилизацию неферментируемых источников углерода [77]. Делеция гена *TOM70*, кодирующего компонент системы транспорта белков из цитоплазмы в митохондрии, также приводила к сокращению РПЖ дрожжей [49]. Аналогичный эффект наблюдался при делеции гена митохондриальной протеазы *PIM1*, необходимой для поддержания протеостаза в митохондриальном матриксе [78]. Причина увеличения скорости старения материнских клеток дрожжей при нарушении работы митохондрий, вероятно, связана с тем, что при этом увеличивается доля клеток, стареющих по второму сценарию, связанному со снижением концентрации гема, обладающих более низкой РПЖ, чем клетки, стареющие по первому сце-

нарию, связанному с нарушением сайленсинга хроматина [25].

Нарушение работы митохондрий с помощью ингибиторов митохондриальных ферментов (антимидин А, олигомицин D) и протонофоров, вызывающих деполяризацию митохондрий и стимулирующих дыхание, так же как и потеря мтДНК, разнонаправленно действует на РПЖ [76, 79]. С одной стороны, слабый протонофор динитрофенол (в концентрации 5 мМ) несколько увеличивал РПЖ в штамме *W303-1A* [79]. Эффект динитрофенола, по всей видимости, связан с активацией сигнального пути Rtg, передающего сигнал от неработающих митохондрий к ядру. Известно, что протонофоры вызывают активацию гена *PDR5* – одного из маркерных генов, мишеней ретроградной сигнализации [80]. Сигнальный путь Rtg, в свою очередь, индуцирует адаптивный ответ, продлевающий жизнь [81].

С другой стороны, добавление «сильного» протонофора карбонил цианид-п-трифторметоксифенилгидразона приводило к резкому снижению РПЖ в штамме *BY4741* [82]. С чем может быть связан эффект снижения РПЖ под действием разобщителей? Снижение трансмембранного потенциала митохондрий, вызванное протонофорами, селективно токсично для клеток с ограниченной возможностью генерировать трансмембранный потенциал. Известно, что анионные протонофоры более токсичны для клеток *rho⁰*, в которых трансмембранный потенциал генерируется транслокатором адениновых нуклеотидов ANT, чем для клеток *rho⁺* дрожжей, в которых функционирует дыхательная цепь [83, 84]. В то же время с увеличением репликативного возраста в клетках дрожжей происходит накопление нарушений в митохондриях, а также увеличивается вероятность полной потери мтДНК и дыхательной активности, что обсуждалось выше. Следовательно, высокие концентрации протонофоров могут быть просто селективно токсичны для старых клеток, по сравнению с молодыми клетками, и поэтому сокращать РПЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Асимметричное распределение митохондрий в зависимости от их функционального состояния между материнской и дочерней клетками приводит к тому, что в материнской клетке накапливаются дефектные митохондрии. В результате изменения в структуре и функциях митохондрий происходят на ран-

них этапах репликативного старения дрожжей. С возрастом в материнской клетке возникает дефицит закодированных в ядре белков, локализованных во внутренней мембране митохондрий и митохондриального матрикса. Это приводит к мутациям или полной потере мтДНК. Одновременно происходит накопление токсичных предшественников митохондриальных белков в цитоплазме. Однако с возрастом дрожжевая клетка все более зависит от окислительного метаболизма, в то время как молодые клетки в большей степени полагаются на гликолиз. С возрастом происходит увеличение интенсивности пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот, снижается концентрация АТФ в клетках и увеличивается скорость биосинтеза глицерина [85]. Таким образом, с одной стороны, с возрастом нарастают проблемы с функционированием митохондрий, а с другой стороны, логика последовательных изменений настроек метаболизма в клетке делает ее все более зависимой от этих функций. Можно предположить, что это противоречие и приводит к снижению скорости роста, а затем – к гибели клеток.

Вклад дисфункции митохондрий в снижение жизнеспособности старых клеток указывает на то, что клетки с исходно заблокированным окислительным фосфорилированием будут стареть быстрее. Однако эксперименты показывают, что РПЖ дрожжей зависит не столько от наличия мтДНК и возможности окислительного фосфорилирования, сколько от способа, которым клетки адаптируются к митохондриальной дисфункции. Таким образом, дрожжевая модель старения указывает на одну из наиболее уязвимых к накоплению ошибок и дерегуляции систем в клетке, нарушение которой приводит к снижению надежности всей системы. Этой системой является механизм координации работы митохондрий и ядра – механизм, возникший за миллиард лет эволюции, прошедших с момента симбиогенеза архей и предков митохондрий.

Вклад авторов. А.А. и Д.К. принимали участие в анализе литературы и написании текста; Д.К. подготовил иллюстрации.

Финансирование. Работа написана при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00108).

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. Kirkwood, T. B., and Austad, S. N. (2000) Why do we age? *Nature*, **408**, 233–238, doi: 10.1038/35041682.
2. Flatt, T., and Partridge, L. (2018) Horizons in the evolution of aging, *BMC Biol.*, **16**, 93, doi: 10.1186/s12915-018-0562-z.
3. Wensink, M. J., and Cohen, A. A. (2021) The dاناид theory of aging, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 671208, doi: 10.3389/fcell.2021.671208.
4. Mortimer, R. K., and Johnston, J. R. (1959) Life span of individual yeast cells, *Nature*, **183**, 1751–1752, doi: 10.1038/1831751a0.
5. Barker, M. G., and Walmsley, R. M. (1999) Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast*, **15**, 1511–1518, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1511::AID-YEA482>3.0.CO;2-Y.
6. Ackermann, M., Stearns, S. C., and Jenal, U. (2003) Senescence in a bacterium with asymmetric division, *Science*, **300**, 1920, doi: 10.1126/science.1083532.
7. Bouklas, T., and Fries, B. C. (2015) Aging as an emergent factor that contributes to phenotypic variation in *Cryptococcus neoformans*, *Fungal Genet. Biol.*, **78**, 59–64, doi: 10.1016/j.fgb.2014.10.004.
8. Laun, P., Bruschi, C. V., Dickinson, J. R., Rinnerthaler, M., Heeren, G., Schwimbersky, R., Rid, R., and Breitenbach, M. (2007) Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7514–7526, doi: 10.1093/nar/gkm919.
9. Barros, M. H., da Cunha, F. M., Oliveira, G. A., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2010) Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 494–502, doi: 10.1016/j.mad.2010.04.008.
10. Jazwinski, S. M., Jiang, J. C., and Kim, S. (2018) Adaptation to metabolic dysfunction during aging: making the best of a bad situation, *Exp. Gerontol.*, **107**, 87–90, doi: 10.1016/j.exger.2017.07.013.
11. Botstein, D., and Fink, G. R. (2011) Yeast: an experimental organism for 21st Century biology, *Genetics*, **189**, 695–704, doi: 10.1534/genetics.111.130765.
12. Campos, S. E., and DeLuna, A. (2019) Functional genomics of dietary restriction and longevity in yeast, *Mech. Ageing Dev.*, **179**, 36–43, doi: 10.1016/j.mad.2019.02.003.
13. Novarina, D., Janssens, G. E., Bokern, K., Schut, T., van Oerle, N. C., Kazemier, H. G., Veenhoff, L. M., and Chang, M. (2020) A genome-wide screen identifies genes that suppress the accumulation of spontaneous mutations in young and aged yeast cells, *Aging Cell*, **19**, e13084, doi: 10.1111/accel.13084.
14. Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., Scherer, B., and Sinclair, D. A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan, *Nature*, **425**, 191–196, doi: 10.1038/nature01960.
15. Okamoto, N., Sato, Y., Kawagoe, Y., Shimizu, T., and Kawamura, K. (2022) Short-term resveratrol treatment restored the quality of oocytes in aging mice, *Aging*, **14**, 5628–5640, doi: 10.18632/aging.204157.
16. McCormick, M. A., Delaney, J. R., Tsuchiya, M., Tsuchiyama, S., Shemorry, A., Sim, S., Chou, A. C.-Z., Ahmed, U., Carr, D., Murakami, C. J., Schleit, J., Sutphin, G. L., Wasko, B. M., Bennett, C. F., Wang, A. M., Olsen, B., Beyer, R. P., Bammler, T. K., Prunkard, D., Johnson, S. C., Pennypacker, J. K., An, E., Anies, A., Castanza, A. S., Choi, E., Dang, N., Enerio, S., Fletcher, M., Fox, L., Goswami, S., Higgins, S. A., Holmberg, M. A., Hu, D., Hui, J., Jelic, M., Jeong, K.-S., Johnston, E., Kerr, E. O., Kim, J., Kim, D., Kirkland, K., Klum, S., Kotireddy, S., Liao, E., Lim, M., Lin, M. S., Lo, W. C., Lockshon, D., Miller, H. A., Moller, R. M., Muller, B., Oakes, J., Pak, D. N., Peng, Z. J., Pham, K. M., Pollard, T. G., Pradeep, P., Pruett, D., Rai, D., Robison, B., Rodriguez, A. A., Ros, B., Sage, M., Singh, M. K., Smith, E. D., Snead, K., Solanky, A., Spector, B. L., Steffen, K. K., Tchao, B. N., Ting, M. K., Vander Wende, H., Wang, D., Welton, K. L., Westman, E. A., Brem, R. B., Liu, X. G., Suh, Y., Zhou, Z., Kaerberlein, M., and Kennedy, B. K. (2015) A comprehensive analysis of replicative lifespan in 4,698 single-gene deletion strains uncovers conserved mechanisms of aging, *Cell. Metab.*, **22**, 895–906, doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.008.
17. Smith, E. D., Tsuchiya, M., Fox, L. A., Dang, N., Hu, D., Kerr, E. O., Johnston, E. D., Tchao, B. N., Pak, D. N., Welton, K. L., Promislow, D. E. L., Thomas, J. H., Kaerberlein, M., and Kennedy, B. K. (2008) Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species, *Genome Res.*, **18**, 564–570, doi: 10.1101/gr.074724.107.
18. He, C., Zhou, C., and Kennedy, B. K. (2018) The yeast replicative aging model, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1864**, 2690–2696, doi: 10.1016/j.bbadis.2018.02.023.
19. Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J. I., and Guarente, L. (1999) Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9100–9105, doi: 10.1073/pnas.96.16.9100.
20. Knorre, D. A., Azbarova, A. V., Galkina, K. V., Feniouk, B. A., and Severin, F. F. (2018) Replicative aging as a source of cell heterogeneity in budding yeast, *Mech. Ageing Dev.*, **176**, 24–31, doi: 10.1016/j.mad.2018.09.001.
21. Janssens, G. E., Meinema, A. C., González, J., Wolters, J. C., Schmidt, A., Guryev, V., Bischoff, R., Wit, E. C., Veenhoff, L. M., and Heinemann, M.

- (2015) Protein biogenesis machinery is a driver of replicative aging in yeast, *Elife*, **4**, e08527, doi: 10.7554/eLife.08527.
22. Orner, E. P., Zhang, P., Jo, M. C., Bhattacharya, S., Qin, L., and Fries, B. C. (2019) High-throughput yeast aging analysis for *Cryptococcus* (HYAAC) microfluidic device streamlines aging studies in *Cryptococcus neoformans*, *Commun. Biol.*, **2**, 256, doi: 10.1038/s42003-019-0504-5.
 23. Yu, R., Jo, M. C., and Dang, W. (2020) Measuring the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* using the HYAA microfluidic platform, *Methods Mol. Biol.*, **2144**, 1-6, doi: 10.1007/978-1-0716-0592-9_1.
 24. Jin, M., Li, Y., O’Laughlin, R., Bittihn, P., Pillus, L., Tsimring, L. S., Hasty, J., and Hao, N. (2019) Divergent aging of isogenic yeast cells revealed through single-cell phenotypic dynamics, *Cell Syst.*, **8**, 242-253. e3, doi: 10.1016/j.cels.2019.02.002.
 25. Li, Y., Jiang, Y., Paxman, J., O’Laughlin, R., Klepin, S., Zhu, Y., Pillus, L., Tsimring, L. S., Hasty, J., and Hao, N. (2020) A programmable fate decision landscape underlies single-cell aging in yeast, *Science*, **369**, 325-329, doi: 10.1126/science.aax9552.
 26. Atamna, H., Killilea, D. W., Killilea, A. N., and Ames, B. N. (2002) Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14807-14812, doi: 10.1073/pnas.192585799.
 27. Xie, Z., Zhang, Y., Zou, K., Brandman, O., Luo, C., Ouyang, Q., and Li, H. (2012) Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device, *Aging Cell*, **11**, 599-606, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00821.x.
 28. Krämer, L., Dalheimer, N., Räschele, M., Storchová, Z., Pielage, J., Boos, F., and Herrmann, J. M. (2023) MitoStores: chaperone-controlled protein granules store mitochondrial precursors in the cytosol, *EMBO J.*, **42**, e112309, doi: 10.15252/embj.2022112309.
 29. Seppä, L., Hänninen, A.-L., and Makarow, M. (2004) Upregulation of the Hsp104 chaperone at physiological temperature during recovery from thermal insult, *Mol. Microbiol.*, **52**, 217-225, doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03959.x.
 30. Zhou, Z., Liu, Y., Feng, Y., Klepin, S., Tsimring, L. S., Pillus, L., Hasty, J., and Hao, N. (2023) Engineering longevity-design of a synthetic gene oscillator to slow cellular aging, *Science*, **380**, 376-381, doi: 10.1126/science.add7631.
 31. Yang, J., McCormick, M. A., Zheng, J., Xie, Z., Tsuchiya, M., Tsuchiyama, S., El-Samad, H., Ouyang, Q., Kaerberlein, M., Kennedy, B. K., and Li, H. (2015) Systematic analysis of asymmetric partitioning of yeast proteome between mother and daughter cells reveals “aging factors” and mechanism of lifespan asymmetry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11977-11982, doi: 10.1073/pnas.1506054112.
 32. Zhou, C., Slaughter, B. D., Unruh, J. R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, R. T., McClain, M., and Li, R. (2014) Organelle-based aggregation and retention of damaged proteins in asymmetrically dividing cells, *Cell*, **159**, 530-542, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.026.
 33. Hill, S. M., Hanzén, S., and Nyström, T. (2017) Restricted access: spatial sequestration of damaged proteins during stress and aging, *EMBO Rep.*, **18**, 377-391, doi: 10.15252/embr.201643458.
 34. Kumar, S., de Boer, R., and van der Klei, I. J. (2018) Yeast cells contain a heterogeneous population of peroxisomes that segregate asymmetrically during cell division, *J. Cell Sci.*, **131**, jcs207522, doi: 10.1242/jcs.207522.
 35. Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M., and Westermann, B. (2011) The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast, *J. Cell Biol.*, **194**, 473-488, doi: 10.1083/jcb.201012088.
 36. Itoh, T., Toh-E, A., and Matsui, Y. (2004) Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast, *EMBO J.*, **23**, 2520-2530, doi: 10.1038/sj.emboj.7600271.
 37. Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J., and Westermann, B. (2013) The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture, *J. Cell Sci.*, **126**, 2924-2930, doi: 10.1242/jcs.126045.
 38. Pernice, W. M., Vevea, J. D., and Pon, L. A. (2016) A role for Mfb1p in region-specific anchorage of high-functioning mitochondria and lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Commun.*, **7**, 10595, doi: 10.1038/ncomms10595.
 39. Pernice, W. M., Swayne, T. C., Boldogh, I. R., and Pon, L. A. (2017) Mitochondrial tethers and their impact on lifespan in budding yeast, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **5**, 120, doi: 10.3389/fcell.2017.00120.
 40. McFaline-Figueroa, J. R., Vevea, J., Swayne, T. C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I. R., and Pon, L. A. (2011) Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast, *Aging Cell*, **10**, 885-895, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00731.x.
 41. Manzano-López, J., Matellán, L., Álvarez-Llamas, A., Blanco-Mira, J. C., and Monje-Casas, F. (2019) Asymmetric inheritance of spindle microtubule-organizing centres preserves replicative lifespan, *Nat. Cell. Biol.*, **21**, 952-965, doi: 10.1038/s41556-019-0364-8.
 42. Hughes, A. L., and Gottschling, D. E. (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast, *Nature*, **492**, 261-265, doi: 10.1038/nature11654.
 43. Azbarova, A. V., Galkina, K. V., Sorokin, M. I., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2017) The contribution of *Saccharomyces cerevisiae* replicative age to

- the variations in the levels of Trx2p, Pdr5p, Can1p and Idh isoforms, *Sci. Rep.*, **7**, 13220, doi: 10.1038/s41598-017-13576-w.
44. Galkina, K. V., Zyrina, A. N., Golyshev, S. A., Kashko, N. D., Markova, O. V., Sokolov, S. S., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2020) Mitochondrial dynamics in yeast with repressed adenine nucleotide translocator AAC2, *Eur. J. Cell Biol.*, **99**, 151071, doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151071.
 45. Nguyen, T. T. M., Iwaki, A., Ohya, Y., and Izawa, S. (2014) Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 33-38, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.008.
 46. Rogov, A. G., Ovchenkova, A. P., Goleva, T. N., Kireev, I. I., and Zvyagilskaya, R. A. (2017) New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors, *Anal. Biochem.*, **552**, 24-29, doi: 10.1016/j.ab.2017.04.003.
 47. Scheckhuber, C. Q., Erjavec, N., Tinazli, A., Hamann, A., Nyström, T., and Osiewacz, H. D. (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 99-105, doi: 10.1038/ncb1524.
 48. Poveda-Huertes, D., Taskin, A. A., Dhaouadi, I., Myketin, L., Marada, A., Habernig, L., Büttner, S., and Vögtle, F.-N. (2021) Increased mitochondrial protein import and cardiolipin remodelling upon early mtUPR, *PLoS Genet.*, **17**, e1009664, doi: 10.1371/journal.pgen.1009664.
 49. Liu, Q., Chang, C. E., Wooldredge, A. C., Fong, B., Kennedy, B. K., and Zhou, C. (2022) Tom70-based transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis and aging, *Elife*, **11**, e75658, doi: 10.7554/eLife.75658.
 50. Veatch, J. R., McMurray, M. A., Nelson, Z. W., and Gottschling, D. E. (2009) Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect, *Cell*, **137**, 1247-1258, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.014.
 51. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.-D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.-Y., Ward, T. R., Wilhelm, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Nature*, **418**, 387-391, doi: 10.1038/nature00935.
 52. Janouškovec, J., Tikhonenkov, D. V., Burki, F., Howe, A. T., Rohwer, F. L., Mylnikov, A. P., and Keeling, P. J. (2017) A new lineage of eukaryotes illuminates early mitochondrial genome reduction, *Curr. Biol.*, **27**, 3717-3724.e5, doi: 10.1016/j.cub.2017.10.051.
 53. Kirchman, P. A., Kim, S., Lai, C. Y., and Jazwinski, S. M. (1999) Interorganellar signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **152**, 179-190, doi: 10.1093/genetics/152.1.179.
 54. Borghouts, C., Benguria, A., Wawryn, J., and Jazwinski, S. M. (2004) Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity, *Genetics*, **166**, 765-777, doi: 10.1093/genetics/166.2.765.
 55. Woo, D. K., and Poyton, R. O. (2009) The absence of a mitochondrial genome in rho0 yeast cells extends lifespan independently of retrograde regulation, *Exp. Gerontol.*, **44**, 390-397, doi: 10.1016/j.exger.2009.03.001.
 56. Miceli, M. V., Jiang, J. C., Tiwari, A., Rodriguez-Quinones, J. F., and Jazwinski, S. M. (2011) Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan, *Front. Genet.*, **2**, 102, doi: 10.3389/fgene.2011.00102.
 57. Jiang, J. C., Stumpferl, S. W., Tiwari, A., Qin, Q., Rodriguez-Quinones, J. F., and Jazwinski, S. M. (2016) Identification of the target of the retrograde response that mediates replicative lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **204**, 659-673, doi: 10.1534/genetics.116.188086.
 58. Heeren, G., Jarolim, S., Laun, P., Rinnerthaler, M., Stolze, K., Perrone, G. G., Kohlwein, S. D., Nohl, H., Dawes, I. W., and Breitenbach, M. (2004) The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway, *FEMS Yeast Res.*, **5**, 157-167, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.05.008.
 59. Kaerberlein, M., Hu, D., Kerr, E. O., Tsuchiya, M., Westman, E. A., Dang, N., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005) Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast, *PLoS Genet.*, **1**, e69, doi: 10.1371/journal.pgen.0010069.
 60. Kaerberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005) Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background, *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 491-504, doi: 10.1016/j.mad.2004.10.007.
 61. Traven, A., Wong, J. M., Xu, D., Sopta, M., and Ingles, C. J. (2001) Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial DNA mutant, *J. Biol. Chem.*, **276**, 4020-4027, doi: 10.1074/jbc.M006807200.

62. Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R., and Butow, R. A. (2001) Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction, *Mol. Biol. Cell*, **12**, 297-308, doi: 10.1091/mbc.12.2.297.
63. Liu, S., Liu, S., He, B., Li, L., Li, L., Wang, J., Cai, T., Chen, S., and Jiang, H. (2021) OXPPOS deficiency activates global adaptation pathways to maintain mitochondrial membrane potential, *EMBO Rep.*, **22**, e51606, doi: 10.15252/embr.202051606.
64. Liu, Z., and Butow, R. A. (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6720-6728, doi: 10.1128/MCB.19.10.6720.
65. Starovoytova, A. N., Sorokin, M. I., Sokolov, S. S., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2013) Mitochondrial signaling in *Saccharomyces cerevisiae* pseudohyphae formation induced by butanol, *FEMS Yeast Res.*, **13**, 367-374, doi: 10.1111/1567-1364.12039.
66. Kwan, E. X., Wang, X. S., Amemiya, H. M., Brewer, B. J., and Raghuraman, M. K. (2016) rDNA copy number variants are frequent passenger mutations in *Saccharomyces cerevisiae* deletion collections and *de novo* transformants, *G3*, **6**, 2829-2838, doi: 10.1534/g3.116.030296.
67. Hotz, M., Thayer, N. H., Hendrickson, D. G., Schinski, E. L., Xu, J., and Gottschling, D. E. (2022) rDNA array length is a major determinant of replicative lifespan in budding yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2119593119, doi: 10.1073/pnas.2119593119.
68. Garcia, E. J., de Jonge, J. J., Liao, P.-C., Stivison, E., Sing, C. N., Higuchi-Sanabria, R., Boldogh, I. R., and Pon, L. A. (2019) Reciprocal interactions between mtDNA and lifespan control in budding yeast, *Mol. Biol. Cell*, **30**, 2943-2952, doi: 10.1091/mbc.E18-06-0356.
69. Morgenstern, M., Stiller, S. B., Lübbert, P., Peikert, C. D., Dannenmaier, S., Drepper, F., Weill, U., Höß, P., Feuerstein, R., Gebert, M., Bohnert, M., van der Laan, M., Schuldiner, M., Schütze, C., Oeljeklaus, S., Pfanner, N., Wiedemann, N., and Warscheid, B. (2017) Definition of a high-confidence mitochondrial Proteome at quantitative scale, *Cell Rep.*, **19**, 2836-2852, doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.014.
70. Puddu, F., Herzog, M., Selivanova, A., Wang, S., Zhu, J., Klein-Lavi, S., Gordon, M., Meirman, R., Millan-Zambrano, G., Ayestaran, I., Salguero, I., Sharan, R., Li, R., Kupiec, M., and Jackson, S. P. (2019) Genome architecture and stability in the *Saccharomyces cerevisiae* knockout collection, *Nature*, **573**, 416-420, doi: 10.1038/s41586-019-1549-9.
71. Heeren, G., Rinnerthaler, M., Laun, P., von Seyerl, P., Kössler, S., Klinger, H., Hager, M., Bogengruber, E., Jarolim, S., Simon-Nobbe, B., Schüller, C., Carmona-Gutierrez, D., Breitenbach-Koller, L., Mück, C., Jansen-Dürr, P., Criollo, A., Kroemer, G., Madeo, F., and Breitenbach, M. (2009) The mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, Afo1p, determines cellular longevity through mitochondrial back-signaling via TOR1, *Aging*, **1**, 622-636, doi: 10.18632/aging.100065.
72. Caballero, A., Ugidos, A., Liu, B., Öling, D., Kvint, K., Hao, X., Mignat, C., Nachin, L., Molin, M., and Nyström, T. (2011) Absence of mitochondrial translation control proteins extends life span by activating sirtuin-dependent silencing, *Mol. Cell*, **42**, 390-400, doi: 10.1016/j.molcel.2011.03.021.
73. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **440**, 325-331, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01467-7.
74. Bykov, Y. S., Flohr, T., Boos, F., Zung, N., Herrmann, J. M., and Schuldiner, M. (2022) Widespread use of unconventional targeting signals in mitochondrial ribosome proteins, *EMBO J.*, **41**, e109519, doi: 10.15252/embj.2021109519.
75. Piper, P. W., Jones, G. W., Bringloe, D., Harris, N., MacLean, M., and Mollapour, M. (2002) The shortened replicative life span of prohibitin mutants of yeast appears to be due to defective mitochondrial segregation in old mother cells, *Aging Cell*, **1**, 149-157, doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00018.x.
76. Yi, D.-G., Hong, S., and Huh, W.-K. (2018) Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS-dependent ROS production by the ER-localized NADPH oxidase Yno1, *PLoS One*, **13**, e0198619, doi: 10.1371/journal.pone.0198619.
77. Stenger, M., Le, D. T., Klecker, T., and Westermann, B. (2020) Systematic analysis of nuclear gene function in respiratory growth and expression of the mitochondrial genome in *S. cerevisiae*, *Microb. Cell*, **7**, 234-249, doi: 10.15698/mic2020.09.729.
78. Erjavec, N., Bayot, A., Gareil, M., Camougrand, N., Nystrom, T., Friguet, B., and Bulteau, A.-L. (2013) Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome, *Free Radic. Biol. Med.*, **56**, 9-16, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.019.
79. Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004) Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 49883-49888, doi: 10.1074/jbc.M408918200.
80. Galkina, K. V., Finkelberg, J. M., Markova, O. V., Azbarova, A. V., Banerjee, A., Kumari, S., Sokolov, S. S., Severin, F. F., Prasad, R., and Knorre, D. A. (2020) Protonophore FCCP provides fitness advantage to PDR-deficient yeast cells, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **52**, 383-395, doi: 10.1007/s10863-020-09849-1.
81. Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V., and Jazwinski, S. M. (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging

- in yeast, *FASEB J.*, **14**, 2135-2137, doi: 10.1096/fj.00-0242fje.
82. Stöckl, P., Zankl, C., Hütter, E., Unterluggauer, H., Laun, P., Heeren, G., Bogengruber, E., Herndler-Brandstetter, D., Breitenbach, M., and Jansen-Dürr, P. (2007) Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 947-958, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.005.
83. Dupont, C.-H., Mazat, J. P., and Guerin, B. (1985) The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from q^+ and q^o strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 1116-1123, doi: 10.1016/0006-291X(85)91922-9.
84. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Cherepanov, D. A., Knorre, D. A., Korshunova, G. A., Markova, O. V., Ojovan, S. M., Perevoshchikova, I. V., Pustovidko, A. V., Rokitskaya, T. I., Severina, I. I., Simonyan, R. A., Smirnova, E. A., Sobko, A. A., Sumbatyan, N. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2011) Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers, *J. Biol. Chem.*, **286**, 17831-17840, doi: 10.1074/jbc.M110.212837.
85. Leupold, S., Hubmann, G., Litsios, A., Meinema, A. C., Takhaveev, V., Papagiannakis, A., Niebel, B., Janssens, G., Siegel, D., and Heinemann, M. (2019) *Saccharomyces cerevisiae* goes through distinct metabolic phases during its replicative lifespan, *Elife*, **8**, e41046, doi: 10.7554/eLife.41046.

ROLE OF MITOCHONDRIAL DNA IN YEAST REPLICATIVE AGING

Review

A. V. Azbarova^{1,2} and D. A. Knorre^{1*}

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

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

Despite the variety of manifestations of aging, there are some common features and underlying mechanisms. In particular, mitochondria appears to be one of the most vulnerable systems in both metazoa and fungi. In this review, we discuss how mitochondrial dysfunction is related to replicative aging in the simplest eukaryotic model, the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We discuss a chain of events that starts from asymmetric inheritance of mitochondria by mother and daughter cells. With age, yeast mother cells start to experience a decrease in mitochondrial transmembrane potential and, consequently, a decrease in mitochondrial protein import efficiency. This induces mitochondrial protein precursors accumulation in the cytoplasm, the loss of mitochondrial DNA, and at the later stages – cell death. Interestingly, yeast strains without mitochondrial DNA can have both increased and increased lifespan compared to their counterparts with mtDNA. The direction of the effect depends on their ability to activate compensatory mechanisms preventing or mitigating negative consequences of mitochondrial dysfunction. The central role of mitochondria in yeast aging and death indicates that it is one of the most complex and, therefore, deregulation-prone systems in eukaryotic cells.

Keywords: yeast, development, aging, mitochondrial DNA, mitochondrial dysfunction

УДК 577.25

СЕРОТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Обзор

© 2023 Д.В. Еремин^{1*}, Е.М. Кондаурова¹, А.Я. Родный¹,
К.А. Молобекова¹, Д.А. Кудлай², В.С. Науменко¹

¹ ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: dima.969696@mail.ru

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.07.2023

После доработки 26.09.2023

Принята к публикации 29.09.2023

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее частой причиной деменции во всем мире, оказывая все большее влияние на стареющее общество. Известно, что серотониновая (5-НТ) система мозга, помимо своей важнейшей роли в контроле различных физиологических функций и видов поведения, принимает участие в регуляции миграции, пролиферации, дифференцировки, созревании и программируемой гибели нейронов. При этом все больше данных указывает на вовлечение 5-НТ-нейротрансмиссии в механизмы, лежащие в основе формирования нерастворимых агрегатов β -амилоида и тау-белка, являющихся основными гистопатологическими признаками БА. В данном обзоре мы сосредоточили наше внимание на имеющихся данных об участии различных рецепторов 5-НТ и индуцируемых ими внутриклеточных сигнальных каскадов в патологических процессах, приводящих к развитию БА. В первую очередь это касается сведений о вовлечении рецепторов 5-НТ в механизмы агрегации белков при БА, которые указывают на то, что специфические изменения в функции определенных рецепторов 5-НТ или связанных с ними внутриклеточных посредников передачи сигнала препятствуют накоплению β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков тау-белка. На основе накопленных экспериментальных данных можно предположить, что использование 5-НТ-рецепторов в качестве новых мишеней лекарственных средств может быть полезно не только для улучшения когнитивной деятельности при БА, но и сыграть важную роль в лечении причин деменции, связанной с БА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Альцгеймера, серотониновая система мозга, рецепторы 5-НТ, β -амилоид, тау-белок, агрегация белков.

DOI: 10.31857/S0320972523120059, **EDN:** NJYYUB

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на длительную историю изучения болезни Альцгеймера (БА), ее патофизиология до сих пор вызывает споры. Существует много гипотез, но преобладающей гипотезой считается «гипотеза амилоидного каскада» [1, 2].

Болезнь впервые была описана Алоизом Альцгеймером более ста лет назад (в 1906 г.), при описании случая Огюст Детер, 51-летней женщины, страдающей от потери памяти, дезориентации и галлюцинаций. При этом симптомы не подходили под описание ни одного из ранее открытых заболеваний [3].

Принятые сокращения: А β – β -амилоид; БА – болезнь Альцгеймера; 5-НТ – серотонин; НФК – нейрофибриллярные клубки; APP – белок-предшественник амилоида; CaM – кальмодулин; CDK5 – циклинзависимая киназа 5; ERK1/2 – киназы, регулируемые внеклеточным сигналом; Fyn – протоонкоген тирозин-протеинкиназа Fyn; GIP – белки, взаимодействующие с GPCR; GPCR – суперсемейство рецепторов, сопряженных с G-белком; GRK5 – киназа рецептора, связанная с G-белком-5; CRMR2 – белок-медиатор ответа коллапсина-2; GSK-3 β – бета-киназа гликогенсинтазы-3; LTP – долговременная потенция; PKA – протеинкиназа A; PSD-95 – белок постсинаптической плотности 95; PTEN – гомолог фосфатазы и тензина; sAPP α – растворимый белок-предшественник амилоида; SAP97 – синапс-ассоциированный белок 97.

* Адресат для корреспонденции.

Пресенильная (возраст до 65 лет), или семейная, форма БА составляет около 5% от всех случаев БА и является почти полностью генетически детерминированным заболеванием, тогда как старческая, или спорадическая, встречается намного чаще и зависит от множества факторов [4]. Процент людей с БА резко увеличивается с возрастом: 3% людей в возрасте 65–74 г., 17% людей в возрасте 75–84 г. и 32% людей в возрасте 85 лет и старше страдают БА. Однако, независимо от возраста манифестации, БА характеризуется одинаковыми симптомами. При БА происходит атрофия нервных клеток в первую очередь в коре головного мозга, гиппокампе и других подкорковых структурах, что приводит к прогрессирующей потере памяти, ухудшению когнитивных функций и тяжелой деменции [5]. Помимо когнитивных нарушений, у больных развиваются также нейропсихиатрические симптомы, такие как депрессия, апатия, раздражительность, в некоторых случаях – галлюцинации. Кроме того, происходит сдвиг циркадных ритмов сна и бодрствования [6].

Основными гистопатологическими признаками БА, которые позволяют диагностировать болезнь при аутопсии, являются скопления белковых агрегатов, среди которых различают амилоидные бляшки и нейрофибрилярные клубки (НФК). Данные агрегаты отличаются друг от друга по морфологии, локализации, составу и патогенезу формирования [4]. И хотя Альцгеймер довольно качественно описал наблюдаемые изменения еще в 1906 г., молекулярная основа, определяющая патологию болезни, β -амилоид, обнаруживаемый в бляшках, и гиперфосфорилированный тау-белок НФК были описаны только в середине 1980-х гг. [7–11].

Современные способы лечения БА являются симптоматическими и не приводят к полному выздоровлению. Со временем БА прогрессирует, что снижает уровень жизни пациентов и усложняет уход за ними. Несмотря на то что БА более 100 лет находится в центре внимания как врачей, так и ученых, механизм возникновения, а, следовательно, и эффективное лечение заболевания так и не найдены. Поэтому в течение последних десятилетий идет активный поиск новых мишеней для лечения БА. В этом отношении весьма перспективной считается серотониновая (5-НТ) система мозга. Активно исследуются агонисты и антагонисты различных рецепторов 5-НТ как в качестве антидепрессантов и антипсихотиков для лечения поведенческих симптомов болезни [12], так и в качестве препаратов, воз-

действующих на причины болезни, а именно на накопление β -амилоида ($A\beta$), гиперфосфорилированного тау-белка и образование НФК [13, 14].

β -АМИЛОИД

В течение многих лет исследования показывали связь аномального отложения $A\beta$ в центральной нервной системе с развитием деменции. Это легло в основу гипотезы о том, что $A\beta$ может быть причиной БА. Однако при старении мозга, даже в здоровом состоянии, также было обнаружено накопление амилоидных бляшек, что вызывает вопрос о том, являются ли они причиной БА. В последние годы были предложены другие гипотезы возникновения ненаследственной формы БА, но на данный момент амилоидная гипотеза ($A\beta$ -гипотеза) остается самым распространенным и признанным патологическим механизмом наследственной формы БА [15–18].

Согласно $A\beta$ -гипотезе, развитие БА обусловлено накоплением и отложением в мозге агрегатов белка $A\beta$ и формированием амилоидных бляшек. Они представляют собой нерастворимые внеклеточные скопления $A\beta$, продуцируемого в ходе последовательного расщепления его белка-предшественника (APP, amyloid precursor protein) несколькими протеазами: α -, β - и γ -секретазами (рис. 1) [19]. Точная функция APP до сих пор не известна, однако предполагается, что она связана с гомеостатической синаптической пластичностью (т.е. регулирует силу возбуждения синапсов) [20], иммунитетом и процессингом липидов [21–23], с ростом и миграцией нейронов, а также с ростом и функционированием нейритов и формированием синаптических связей [3]. В гене, кодирующем APP, найдены 30 мутаций, из которых 25 связаны с БА и приводят к накоплению избыточного количества $A\beta$. Тем не менее одна мутация – A673T обладает защитным свойством и может предотвратить развитие БА, снижая интенсивность формирования изоформ $A\beta$ – $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ (по длине аминокислотных остатков), являющихся маркерами БА [24, 25].

Продолжительный дисбаланс между образованием и расщеплением (усиливающимся при гиперактивации CDK5 комплексом CDK5/p25 [26]) β - и γ -секретазами фрагментов $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$, а также увеличение соотношения $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ приводят к накоплению амилоидных фибрилл $A\beta$, олигомеров и, наконец, крупных агрегированных бляшек $A\beta$, которые

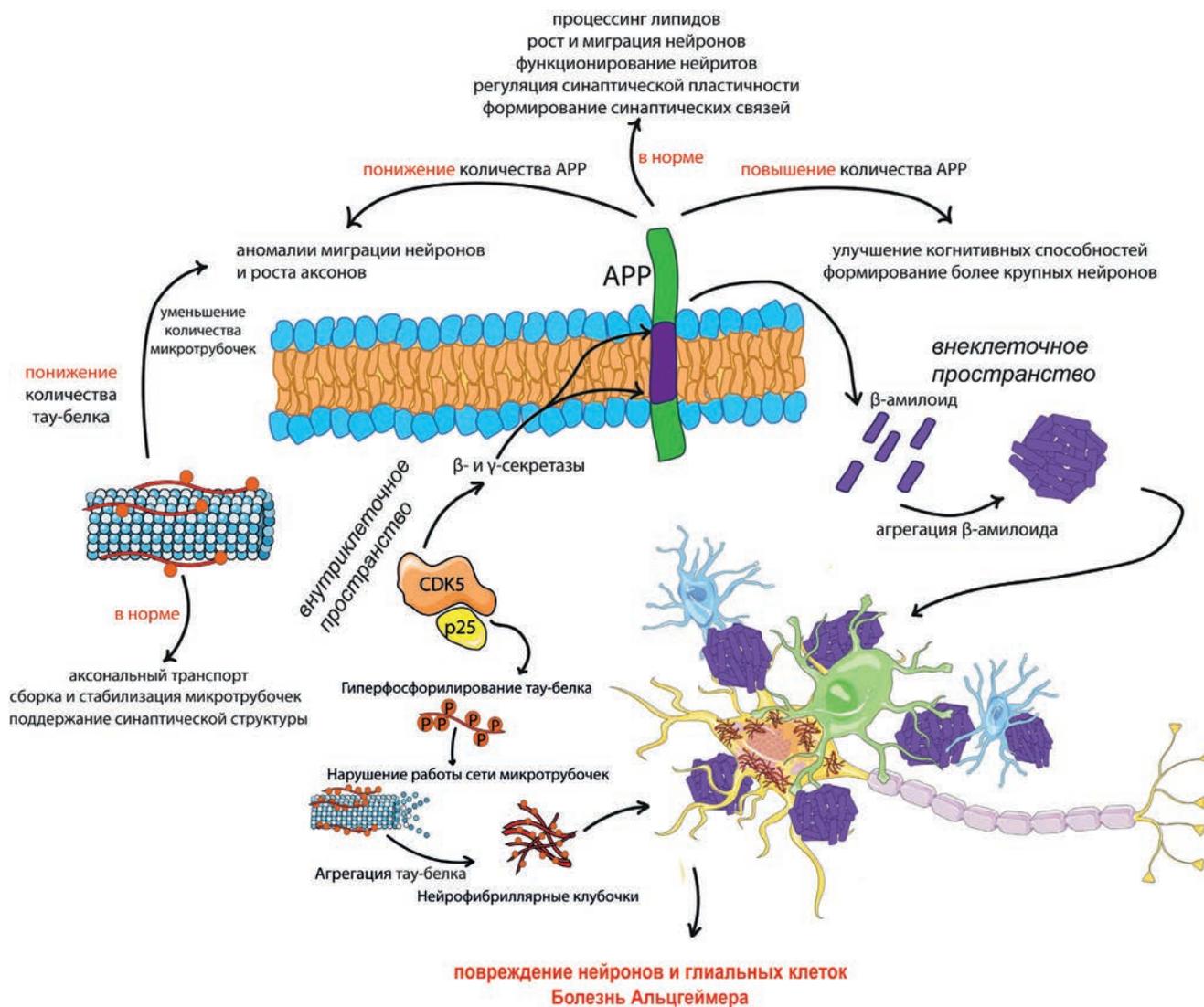


Рис. 1. β-Амилоид и тау-белок в норме и при развитии БА. APP – белок-предшественник амилоида; CDK5 – циклин-зависимая киназа 5; p25 – белок p25

«засоряют» межклеточное пространство между нейронами в мозге (рис. 1) [19]. Согласно амилоидной гипотезе патогенеза БА, такое нарушение баланса между продукцией и разрушением Aβ является ключевым событием, приводящим к нейротоксичности и индукции патологического гиперфосфорилирования тау-белка, а следовательно, к нейродегенерации [27].

Тау-БЕЛОК

Тау-белок относится к семейству белков MAP, ассоциированных с микротрубочками, и участвует в сборке и стабилизации микротрубочек в нейронах, тем самым поддерживая их сложную морфологию (рис. 1). Тау-белок также принимает участие в формировании по-

лярности нейронов, аксональном транспорте и поддержании синаптической структуры [28]. В результате сплайсинга в мозге человека синтезируется 6 изоформ тау-белка, которые отличаются способностью к связыванию с микротрубочками. За эту способность отвечает домен MTBR, который в разных изоформах представлен в разном количестве повторов (3 или 4), что, соответственно, определяет степень сродства к микротрубочкам. Количество MTBR-доменов влияет также на другие свойства тау-белка, в том числе на склонность к агрегации [29, 30].

Каждая изоформа тау-белка может подвергаться множеству посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, гликозилирование, ацетилирование, метилирование и др. Наиболее изученной и часто встречающейся модификацией является фос-

фосфорилирование: из 85 потенциальных сайтов фосфорилирования (аминокислотных остатков Ser и Thr) 31 фосфорилируется в физиологических условиях [31]. От количества и положения фосфатных групп в тау-белке зависит его пространственная конформация и способность связываться с микротрубочками [32]. Многочисленными работами показано, что фосфорилирование тау-белка по различным положениям, например, связанным с БА Ser262 и Ser356, снижает уровень связывания тау-белка с микротрубочками (рис. 1) [33–35].

В норме динамическое равновесие между тау-белком и фосфорилированным тау-белком необходимо для регуляции его субклеточной локализации, а также для обеспечения аксонального транспорта и реорганизации сети микротрубочек при росте нейритов [32]. Степень фосфорилирования тау-белка изменяется в процессе развития, достигая максимального значения в эмбриональный период и уменьшаясь с возрастом, что, вероятно, играет роль в нейрогенезе [36]. Фосфорилирование тау-белка регулируется координированным изменением активности многих киназ и фосфатаз, которое нарушается при БА. Это приводит к тому, что тау-белок фосфорилируется в мозге больных в 3–4 раза больше, чем у здоровых [29]. Если в норме у человека на молекулу тау-белка приходится в среднем 2–3 фосфатные группы, то у человека с БА это число возрастает до восьми [36]. Причем известно, что определенные сайты фосфорилируются исключительно при БА и их фосфорилирование высоко коррелирует с дегенерацией нейронов и когнитивными нарушениями. Так, в работе 2013 г. Martin et al. [31] перечислили 28 сайтов фосфорилирования, которые строго ассоциированы с БА, и еще 16, которые фосфорилируются как при БА, так и в норме. Гиперфосфорилирование тау-белка вызывает серьезные нарушения в клетке, так как приводит к дестабилизации и разборке микротрубочек и, как следствие, к нарушению целостности аксона, синаптических контактов и аксонального транспорта [29]. Кроме того, известно, что избыточное фосфорилирование тау-белка приводит к изменению его пространственной конформации и делает его более склонным к агрегации. В результате тау-белок последовательно полимеризуется сначала в растворимые димеры, затем – в олигомеры, которые в конце концов формируют нерастворимые парные спиральные филаменты и НФК [29].

Ранее считалось, что за нейротоксическое действие тау-белка ответственны наиболее крупные агрегаты, т.е. НФК. Однако в более

поздних работах, например, в обзоре Wang и Mandelkow 2016 г. [36], напротив, предполагается, что нейротоксичностью обладают именно олигомеры тау-белка, а образование НФК представляет собой защитный клеточный ответ. Это подтверждается тем фактом, что нейроны, несущие клубки, могут выживать и нормально функционировать в течение десятков лет [37]. Тем не менее НФК, достигая критических размеров, могут нарушать транспорт внутри нейрона и взаимодействие различных компартментов, что в итоге все же приводит к гибели нейрона [36].

Агрегаты тау-белка могут высвобождаться во внеклеточное пространство и распространяться в мозге от пресинаптического нейрона к постсинаптическим посредством прионоподобных механизмов, что значительно влияет на скорость развития нейродегенеративной патологии [36, 38]. Способность НФК индуцировать агрегацию тау-белка в здоровых клетках была показана в работе, опубликованной Clavaguera et al. [39] в 2009 г.

Считается, что наиболее важную роль в патологическом фосфорилировании тау-белка при БА играет изменение активности бетакиназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3 β , glycogen synthase kinase 3 beta) и CDK5, которое, как предполагают, вызвано воздействием внеклеточного А β [28, 40]. Подтверждение этому можно найти в работе 1996 г. Takashima et al. [41], которые продемонстрировали, что воздействие А β на клеточную культуру нейронов гиппокампа крысы вызывает увеличение активности GSK-3 β и, как следствие, гиперфосфорилирование тау-белка. GSK-3 β фосфорилирует тау-белок по 42 положениям, 29 из которых ассоциированы с БА. Однако для этого киназе необходимо, чтобы тау-белок был «праймирован», т.е. предварительно фосфорилирован по определенному сайту. Праймирование субстрата может катализироваться несколькими киназами, в том числе упомянутой выше CDK5 [31]. CDK5 принадлежит к большому семейству циклинзависимых киназ, но отличается от других членов тем, что не участвует в регуляции клеточного цикла и в основном экспрессируется в нейронах [42]. CDK5 играет роль в развитии и пластичности нервной системы за счет фосфорилирования белков, связанных с миграцией и дифференцировкой нейронов [43]. В связи с важными функциями активность CDK5 находится под строгим контролем и зависит от наличия регуляторных белков, p35 и p39, которые имеют короткий период полужизни, за счет чего достигается очень тонкая регуляция. При БА

регуляция CDK5 нарушается в результате формирования более долгоживущего и стабильного регулятора, p25, который образует с CDK5 гиперактивный комплекс [43]. Данный комплекс вызывает гиперфосфорилирование различных субстратов CDK5, в первую очередь тау-белка, что в конечном счете приводит к гибели клеток. Было показано, что длительная активация CDK5 у мышей приводит к образованию НФК в коре и гиппокампе, тогда как, напротив, подавление активности CDK5 снижает образование НФК [44]. Помимо тау-белка, CDK5 фосфорилирует APP и PSEN1 (белок пресенилин 1, регулирующий в том числе и активность γ -секретазы), что подчеркивает важную роль CDK5 в развитии БА [31]. Также тау-белок связывается с доменами Src-гомологии 3 (SH3) нескольких белков, включая протоонкоген тирозин-протеинкиназу Fyn (Fyn) из семейства Src. Нарушение взаимодействия Fyn-киназы и гиперфосфорилированного тау-белка приводит к гипомиелинизации и прогрессирующей демиелинизации аксонов [40].

БА И СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМА МОЗГА

Давно известно, что БА тесно связана с нарушением моноаминергической нейротрансмиссии, в частности дофаминергической, серотонинергической и норадренергической систем [45, 46]. Кроме БА, было показано, что дефекты в моноаминергических нейротранмиттерных системах ассоциированы с патологическим развитием и клиническими проявлениями первичных таупатий, включая лобно-височную деменцию, прогрессирующий надъядерный паралич и кортикобазальную дегенерацию [47, 48], а также таупатий, вызванных хронической энцефалопатией [49]. Таким образом, ферменты и белки, участвующие в анаболизме и катаболизме нейротранмиттеров, а также их рецепторы являются потенциальными терапевтическими мишенями при множественных таупатологиях, включая БА.

5-НТ-система мозга является одной из самых экспансивных, серотониновые проекции из ядер шва среднего мозга, где локализируются тела 5-НТ-нейронов, образующие многочисленные терминалы во всех структурах мозга, включая лобную кору, височную кору и гиппокамп [50, 51]. На 1 мм² коры мозга крысы насчитывают около 6 млн серотониновых проекций, что соответствует 0,5% всех окончаний переднего мозга. Один 5-НТ-нейрон в среднем

образует около полумиллиона аксональных контактов. Каждый нейрон коры контактирует в среднем с 200 серотониновыми отростками [52]. Старение оказывает комплексное воздействие на центральную 5-НТ-систему. Нарушение 5-НТ-нейротрансмиссии и изменения в экспрессии транспортера 5-НТ (5-НТТ) и рецепторов 5-НТ при старении наблюдаются во многих областях мозга, хотя количество 5-НТ-нейронов существенно не меняется [53].

В ряде исследований показано, что дисфункция 5-НТ-системы связана с развитием БА [53–55]. Количество 5-НТ-нейронов в дорзальных ядрах шва [56, 57], содержание 5-НТ и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты, а также сила связывания для 5-НТТ в коре и гиппокампе значительно снижены при БА [58, 59]. Также нарушается 5-НТ-иннервация в лобных и височных долях мозга [60, 61]. Кроме того, у пациентов с БА наблюдаются более низкие концентрации 5-НТ в тромбоцитах [62, 63] по сравнению с контрольной группой. Было обнаружено, что селективные ингибиторы обратного захвата 5-НТ, включая эсциталопрам [64], циталопрам [65, 66] и флуоксетин [67], оказывают смягчающее воздействие на психические симптомы и когнитивные нарушения у пациентов с БА. Поскольку реализация эффектов 5-НТ на нейроны осуществляется посредством многочисленных рецепторов, растет количество исследований, направленных на изучение функции различных рецепторов 5-НТ при БА и их влияния на патофизиологию болезни.

СЕРОТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В БА

В настоящее время известно минимум 14 различных рецепторов 5-НТ, которые отнесены к 7 семействам (5-НТ₁, 5-НТ₂, 5-НТ₃, 5-НТ₄, 5-НТ₅, 5-НТ₆ и 5-НТ₇). За исключением рецептора 5-НТ₃, который является лиганд-активируемым ионным каналом, все эти рецепторы принадлежат к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR, G-protein coupled receptor) [68]. G-Белки являются GTPазами, которые функционируют как вторичные посредники во внутриклеточных сигнальных каскадах. Название G-белков основано на их сигнальном механизме: они используют замену GDP на GTP как молекулярный функциональный «выключатель» для регулирования клеточных процессов. G_{ai}-Белки ингибируют аденилатциклазу, тем самым снижая образование cAMP из АТР, и открывают K⁺-каналы, что приводит к гиперполяри-

зации мембраны клетки и снижению скорости возбуждения постсинаптического нейрона. $G_{\alpha s}$ -Белки активируют аденилатциклазу, стимулируя образование сАМР, приводя к деполяризации мембраны клетки. сАМР действует как вторичный посредник, активирующий протеинкиназу А (РКА), которая, в свою очередь, может фосфорилировать множество нижестоящих мишеней. $G_{\alpha q/11}$ -Белки активируют фосфолипазу С, что приводит к мобилизации ионов кальция из внутриклеточных депо и вызывает деполяризацию мембраны. Фосфолипаза С гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP2) до диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP3); IP3 действует как вторичный мессенджер для высвобождения накопленного кальция в цитоплазму, в то время как DAG активирует протеинкиназу С [69, 70].

Рецепторы семейства 5-НТ₁ сопряжены с $G_{\alpha i/o}$ -белком, при активации ингибируют аденилатциклазу и открывают K^+ -каналы. При этом рецепторы активируют ряд внутриклеточных киназ, таких как киназы, регулируемые внеклеточным сигналом (ERK1/2), и GSK-3 β , влияющих на функции самых разнообразных белков [68, 71–74]. Также для данного типа рецепторов имеются данные об их сопряжении не только с $G_{\alpha i/o}$ -, но и с $G_{\alpha q/11}$ -белком [70]. 5-НТ₁-рецепторы экспрессируются в больших количествах в гиппокампе и играют важную роль в регуляции процессов памяти [75].

Рецептор 5-НТ_{1A} является самым хорошо изученным членом этого семейства. Известно, что рецептор 5-НТ_{1A} активно экспрессируется в среднем мозге, лимбических и корковых структурах и является основным тормозным 5-НТ-рецептором в головном мозге. Он также локализуется в пресинаптических терминалях ядер шва, где функционирует в качестве тормозного ауторецептора, контролируя скорость возбуждения 5-НТ-нейронов и секрецию нейротрансмиттера [76]. Однако в контексте исследования роли данного рецептора в патогенезе БА данных значительно меньше. Тем не менее было обнаружено, что плотность рецепторов 5-НТ_{1A} на мембране значительно возрастает через 7 дней после введения А β в гиппокамп крыс. Однако радиолигандное связывание с агонистом рецепторов 5-НТ_{1A} показало, что это усиление экспрессии рецептора не связано с усилением его функции [77, 78]. При этом введение антагонистов рецептора 5-НТ_{1A} (например, NAD-299 и WAY-100635) снижает интенсивность накопления амилоидных бляшек, повышает уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF, brain-derived

neurotrophic factor) в гиппокампе, ослабляет нейровоспаление и окислительный стресс, а также облегчает когнитивный дефицит в различных моделях БА на животных [79–81]. Экспрессия 5-НТ_{1A}-рецептора существенно снижена в зубчатой извилине мышей 3xTgAD, экспрессирующих человеческие мутантные, склонные к агрегации белки: APP^{swe}, tauP301L и PS1M146V. При этом сверхэкспрессия белка Wnt-3a в зубчатой извилине восстанавливает поведенческие нарушения, а также нормализует и экспрессию 5-НТ_{1A}-рецептора [82]. Кроме того, было показано, что эсциталопрам в дозе 80 мкМ снижает гиперфосфорилирование тау-белка после добавления в культуру первичных нейронов А β . При этом эсциталопрам активирует сигнальный путь Akt/GSK-3 β . С другой стороны, агонист рецептора 5-НТ_{1A}, 8-ОН-DPAT, также активирует этот сигнальный путь и снижает гиперфосфорилирование тау-белка. В свою очередь, антагонист 5-НТ_{1A}-рецептора, WAY-100635, блокирует активацию Akt/GSK-3 β -пути и препятствует вызванному эсциталопрамом снижению гиперфосфорилирования тау-белка. Эти данные указывают на то, что влияние эсциталопрама на гиперфосфорилирование тау-белка и на активацию Akt/GSK-3 β сигнального пути опосредуется 5-НТ_{1A}-рецепторами [83]. Сходные результаты были обнаружены и в модели гиперфосфорилирования тау-белка, вызванного стимулятором аденилатциклазы форсколином [84].

В то же время было показано, что эсциталопрам дозозависимо блокирует рецептор 5-НТ₃ (в дозе от 1 до 100 мкМ), единственный рецептор 5-НТ, являющийся лиганд-активируемым ионным каналом [85]. Таким образом, действие эсциталопрама на гиперфосфорилирование тау-белка может осуществляться и через ингибирование данного типа рецептора. Также имеются данные о том, что некоторые препараты, оказывающие положительный эффект на когнитивные способности в различных моделях БА и у пациентов с БА, являются антагонистами рецептора 5-НТ₃ [86].

Рецепторы семейства 5-НТ₂ включают три подтипа: 5-НТ_{2A}, 5-НТ_{2B}, 5-НТ_{2C}. Все рецепторы данного типа сопряжены с $G_{\alpha q/11}$ -белком и реализуют свое действие через фосфолипазу С [69, 70], что приводит к мобилизации ионов кальция из внутриклеточных депо и деполяризации мембраны [87, 88]. На сегодняшний день имеется ряд данных, показывающих тесную взаимосвязь рецепторов 5-НТ₂ с А β -патологией. Применение методов нейровизуализации позволило выявить значительное снижение уровня рецепторов 5-НТ₂ в

неокортексе пациентов с БА [89]. Использование другого подхода, радиолигандного связывания, показало снижение плотности 5-НТ_{2A}-рецептора в мозгу животных, моделирующих БА [90] и пациентов с БА [91, 92]. Более того, молекулярно-биохимические исследования показали, что 5-НТ может индуцировать неамилоидогенный процессинг APP и высвобождение растворимой формы APP (sAPP α) посредством активации рецепторов 5-НТ_{2A} и 5-НТ_{2C} [93]. Хотя есть данные, позволяющие предположить, что рецепторы 5-НТ_{2A} и 5-НТ_{2C} модулируют секрецию sAPP α *in vitro* и *in vivo*, однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, опосредуется ли этот эффект изменением активности α - или β -секретазы и коррелирует ли он с изменением в генерации А β . Также следует отметить, что введение антагонистов 5-НТ_{2A}-рецептора стимулировало процесс аутофагии микроглии, усиливало фагоцитоз А β [94], уменьшало количество амилоидных бляшек и улучшало нарушенную когнитивную деятельность [79].

Вовлечение в регуляцию гиперфосфорилирования тау-белка было обнаружено для 5-НТ_{2C}-рецептора. Четырнадцатичасовое воздействие стрессоров вызывало нарушение долговременной потенциации (LTP, long-term potentiation) и пространственной памяти, а также усиление фосфорилирования (определяли с помощью антител anti-Ser404-phosphorylated tau-protein) тау-белка в областях СА1 и СА3 гиппокампа. Эти эффекты в значительной степени зависели от активации 5-НТ_{2C}-рецептора, которые хорошо экспрессируются в области СА1. Острое введение селективного антагониста 5-НТ_{2C}-рецептора, RS-102 221, до начала стресса предотвращало гиперфосфорилирование тау-белка, а также корректировало дефекты LTP и пространственной памяти [95].

Важно отметить, что с БА связаны также и другие рецепторы 5-НТ-системы, в частности рецептор 5-НТ₄. Он экспрессируется в различных областях лимбической системы (перегородка, гиппокамп и миндалевидное тело) и префронтальной коре и участвует в регуляции дыхательного ритма, обучении, памяти и когнитивных функций [96]. Этот рецептор сопряжен с G_{cs}-белком и активирует передачу сигналов PKA [97], также вовлеченной во множество самых разнообразных клеточных процессов. Примечательно, что 5-НТ₄-рецептор хорошо экспрессируется в областях мозга, играющих важную роль в когнитивных процессах [98]. При БА у человека наблюдается существенное снижение экспрессии гена *Htr4* (ген, кодирующий 5-НТ₄-рецептор) в различ-

ных областях мозга и особенно в гиппокампе [99]. Однако были получены и противоположные данные [100]. Недавно было описано влияние 5-НТ₄-рецептора на неамилоидогенный путь расщепления APP, не приводящий к образованию А β [101]. В этих исследованиях авторы продемонстрировали, что стимуляция 5-НТ₄-рецептора снижает количество пептида А β и запускает неамилоидогенное расщепление APP, что приводит к образованию и высвобождению растворимого пептида sAPP α с нейротрофическими и нейрозащитными свойствами [101, 102]. Нейрохимические и поведенческие исследования показали, что активация рецептора 5-НТ₄ улучшает когнитивные функции [12, 103]. С недавних пор агонисты 5-НТ₄-рецептора вызывают интерес в отношении лечения БА и широко исследуются с точки зрения выявления новых лекарственных средств, оказывающих влияние на этот рецептор. Так, например, *in vitro* и *in vivo* исследования показывают, что активация рецептора 5-НТ₄ при помощи агонистов (например, ML10302, прукалоприд и RS-67333) повышает уровень нейропротекторного sAPP α , уменьшает отложение амилоидных бляшек и восстанавливает когнитивные нарушения через классический путь cAMP/PKA [100, 104].

Имеется ряд работ, указывающих на то, что блокада рецептора 5-НТ₆ антагонистами, например, SB-258585, SB-399885 и SB-271046, может ингибировать образование агрегатов А β и гиперфосфорилированного тау-белка, а также защищать нейроны от вызванной А β нейротоксичности, нейровоспаления, окислительного стресса и апоптоза, облегчать когнитивный дефицит, связанный с БА [12, 86, 104–108]. Также продемонстрировано, что антагонисты рецептора 5-НТ₆ улучшают память и обладают антиамнестическим эффектом в различных моделях нарушения памяти [109]. У пациентов, страдающих БА, показаны изменения внутриклеточных каскадов, связанных с рецептором 5-НТ₆, таких как Gyn-киназный и CDK5-зависимые сигнальные пути [110].

Рецептор 5-НТ₇, как и рецептор 5-НТ₆, сопряжен с G_s-белком и активирует аденилатциклазу при стимуляции [111]. Данные рецепторы локализируются постсинаптически в различных областях центральной нервной системы, таких как гипоталамус, таламус, гиппокамп и кора головного мозга [112]. 5-НТ₇-рецептор играет важную роль в регуляции циркадных ритмов, терморегуляции, модуляции боли [113, 114]. Имеются данные об участии рецептора 5-НТ₇ в регуляции поведения и в механизмах обучения и памяти [14]. Рецепторы 5-НТ₇, располо-

женные на телах 5-НТ-нейронов ядер шва, участвуют в регуляции активности 5-НТ-системы [112, 115]. В 2012 г. было показано, что 5-НТ₇-рецепторы могут образовывать гетеродимеры с рецепторами 5-НТ_{1A}, существенно влияя на функцию последних [116, 117]. Имеются данные об участии рецептора 5-НТ₇ в механизмах регуляции морфологии нейронов, росте и ветвлении нейритов, нейрональных шипиков и синаптогенезе через малые GTPазы семейства Rho, активируемые G₁₂-белком, с которым, как было показано, рецепторы 5-НТ₇ тоже могут быть сопряжены [118, 119]. Весьма вероятно, что это свойство рецепторов 5-НТ₇ опосредует их вовлечение в процессы формирования памяти, которые требуют изменения морфологии синапсов и эффективности синаптической передачи. Действительно, стимуляция 5-НТ₇-рецептора в нейронах гиппокампа приводит к увеличению длины нейритов, дендритных шипиков и синаптической плотности [119]. В модели БА, индуцируемой введением стрептозотоцина (3 мг/кг; 10 мкл; центральное (внутрижелудочковое) введение), хроническая активация рецептора 5-НТ₇ его селективным агонистом, AS-19, приводила к увеличению спайковой активности и возбуждающего постсинаптического потенциала по сравнению с контролем, получавшим физиологический раствор. Более того, введение AS-19 восстанавливало нарушенную стрептозотоцином LTP и снижало интенсивность апоптотических процессов [120]. В модели БА, индуцируемой введением Aβ, было обнаружено, что хроническое введение AS-19 предотвращает накопление β-амилоидных бляшек и улучшает нарушенные когнитивные способности и память [121]. Другой высокоселективный агонист рецептора 5-НТ₇, LP-211, предотвращал повреждение нейронов и нарушения когнитивной деятельности, вызванные введением Aβ [122]. Существуют данные, указывающие на то, что рецепторы 5-НТ₇ принимают участие в модуляции NMDA-глутаматной системы, а активация рецепторов 5-НТ₇ защищает клетки от вызванных глутаматом повреждений, которые являются одной из причин гибели нейронов при БА [123]. Кроме того, активация рецептора 5-НТ₇ снижает интенсивность образования активных форм кислорода [124], а киназы Erk и Akt, активируемые рецептором 5-НТ₇, принимают участие в защите от окислительного стресса [125].

При этом показано, что конститутивная активность 5-НТ₇-рецептора, не зависящая от нейротрансмиттера, связана с гиперфосфорилированием и агрегацией тау-белка. Специфи-

ческое ингибирование конститутивной активности 5-НТ₇-рецептора в клетках, экспрессирующих склонный к агрегации мутантный Tau(R406W)-белок, предотвращает его гиперфосфорилирование и формирование нерастворимых НФК [38].

В обзоре Hedlund 2009 г. [113] приведен список различных лигандов 5-НТ₇-рецептора, применяемых для лечения тревожности, депрессии, шизофрении и расстройств сна. Так, например, селективный антагонист 5-НТ₇-рецептора, SB269970, демонстрирует высокий прокогнитивный эффект на мышах, а вортиоксетин и луразидон, также антагонисты 5-НТ₇-рецептора, были одобрены в качестве прокогнитивных антидепрессантов и антипсихотиков соответственно [14]. Таким образом, до недавних пор 5-НТ₇-рецепторы рассматривались, скорее, как мишень для коррекции поведенческих и когнитивных нарушений, вызванных нейродегенерацией при БА [14]. Однако, принимая во внимание недавние работы [13, 38], 5-НТ₇-рецепторы могут быть использованы и для контроля формирования β-амилоидных бляшек и агрегатов тау-белка.

5-НТ РЕЦЕПТОРНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ В БА

Как говорилось выше, большинство 5-НТ-рецепторов, кроме рецептора 5-НТ₃, являющегося ионным каналом, принадлежат к GPCR [73]. Однако, наряду с каноническими сигнальными путями, запускаемыми субъединицами G-белков, выделяют так называемые белки, взаимодействующие с GPCR (GIP, GPCR-interacting proteins). GIP способны изменять активность рецепторов, проникать в определенные внутриклеточные компартменты и запускать ряд альтернативных сигнальных путей, включая такие, которые не зависят от G-белков. Большое количество GIP и их функций было идентифицировано и описано для 5-НТ-рецепторов, хотя функции некоторых все еще остаются неясными [126].

Среди ряда описанных GIP для рецепторов 5-НТ_{1A}, 5-НТ_{2A} и 5-НТ_{2C} общим является комплекс Ca²⁺/Кальмодулин (CaM), для которого показана возможная роль в механизмах формирования и развития БА. В 1994 г. была предложена «кальциевая гипотеза» патогенеза БА [127], а совсем недавно было предложено уточнить ее до «кальмодулиновой гипотезы» [128]. CaM является универсальным передатчиком внутриклеточных сигналов, регулятором натриевых каналов и натриево-

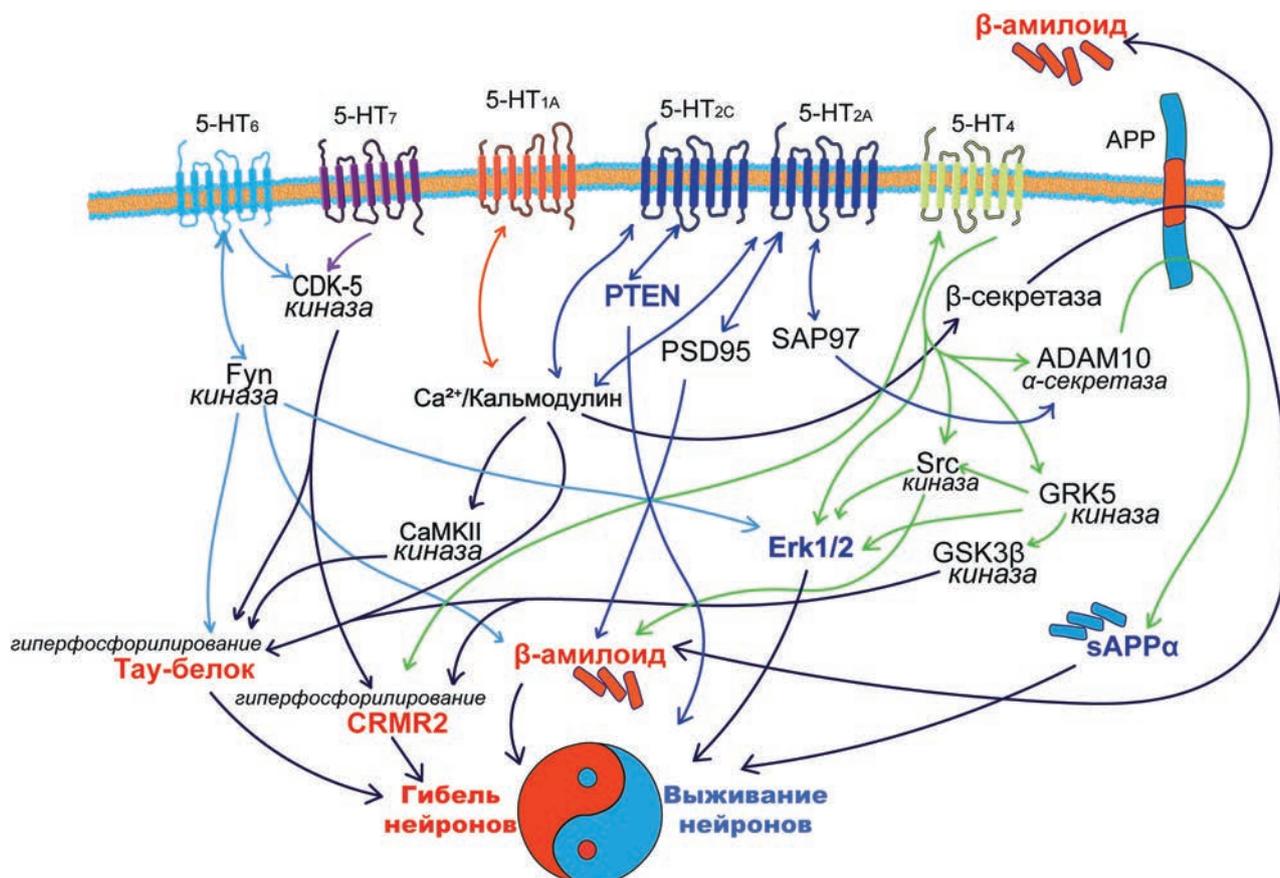


Рис. 2. Взаимодействия между серотониновыми рецепторами и их GIP в механизмах патогенеза БА. CDK5 – циклин-зависимая киназа 5; Src – протоонкоген тирозин-протеинкиназа Src; ADAM10 – белок 10, содержащий домен дез-интегрина и металлопротеиназы; sAPPα – растворимый белок-предшественник амилоида; Fyn – протоонкоген тирозин-протеинкиназа Fyn; ERK1/2 – киназы, регулируемые внеклеточным сигналом; PTEN – гомолог фосфатазы и тензина; PSD-95 – белок постсинаптической плотности 95; SAP97 – синапс-ассоциированный белок 97; CaMKII – кальмодулин-зависимая протеинкиназа; GRK5 – киназа связанного с G-белком рецептора-5; GSK-3β – бета-киназа гликогенсинтазы-3; CRMR2 – белок-медиатор ответа коллапсина-2

го тока, он модулирует нейрональную пластичность, иммунный ответ и мышечные сокращения. Было показано, что активность β-секретазы зависит от количества как CaM, так и ионов Ca²⁺ [129]. После разрезания APP β- и γ-секретазами Aβ подвергается связыванию с CaM с последующим ингибированием полимеризации Aβ (рис. 2) и образованием большого числа высокотоксичных олигомеров, как было показано в недавнем исследовании [130]. Также есть данные об участии CaM в различных аспектах образования внутриклеточных тау-агрегатов. Так, например, CaM связывается с тау-белком и нарушает его связывание с микротрубочками [131, 132]. Кроме того, наряду с CDK5, которая также может выступать в роли белка, связывающего CaM, в фосфорилировании тау-белка принимает участие кальмодулин-зависимая протеинкиназа (CaMKII) [133–135]. Комплекс Ca²⁺/CaM может как непосредственно находиться под контролем рецептора 5-HT_{1A} [74], так и сам

связываться с двумя отдельными участками, расположенными на третьей внутриклеточной петле рецептора, влияя на активацию киназ ERK1/2 и интернализацию/фосфорилирование 5-HT_{1A}-рецептора [136, 137]. Показано схожее взаимодействие CaM с рецепторами 5-HT_{2A} и 5-HT_{2C}: CaM связывается с участками на второй внутриклеточной петле и C-концах рецепторов и ингибирует их связывание с G_q-белком [138].

Рецепторы 5-HT_{2A} и 5-HT_{2C} содержат на своих C-терминалях канонические мотивы для распознавания каркасных PDZ-белков [139, 140]. Некоторым из таких белков приписывается связь с БА. Например, нарушение регуляции белка постсинаптической плотности 95 (PSD-95, postsynaptic density protein 95) (рис. 2), повышающего активность фосфолипазы C, связанной с рецептором 5-HT_{2A}, и вызывающего эндоцитоз этого рецептора [126], вероятно, является важным промежуточным шагом в патологическом каскаде событий, вызванных Aβ:

уровень PSD-95 снижается при старении и нейродегенеративных заболеваниях [141–144], а повышение уровня PSD-95 защищает синапсы от A β [145]. Синапс-ассоциированный белок 97 (SAP97, synapse-associated protein 97) [142], положительно влияющий на опосредованную G $_q$ -белком передачу сигнала и снижающий интенсивность эндоцитоза 5-HT $_{2A}$ -рецептора [126], участвует в динамической транспортировке белков к возбуждающему синапсу [146, 147]. Также SAP97 вовлечен в регуляцию нарушаемого при БА перемещения в синаптические мембраны белка 10, содержащего домен дезинтегрин и металлопротеиназы (ADAM10, a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10), – основной α -секретазы, катализирующей отщепление эктодомена APP в мозге и предотвращающей образование A β (рис. 2) [146]. Кроме того, нарушение ассоциации комплекса ADAM10/SAP97 *in vivo* с помощью специфических пептидов снижает доставку ADAM10 в постсинаптические мембраны и, следовательно, снижает физиологический метаболизм APP [147, 148].

Еще одним потенциально интересным GIP при нейродегенеративных заболеваниях и, в частности БА, является фосфатаза PTEN (phosphatase and tensin homolog), которая взаимодействует с третьей внутриклеточной петлей 5-HT $_{2C}$ -рецептора и препятствует передаче сигнала посредством PI3K/Akt/PKB-пути (рис. 2) [149]. PTEN регулирует многие клеточные процессы, включая пролиферацию, выживание, энергетический метаболизм, клеточную архитектуру, долгосрочную депрессию нейрональных синапсов [150]. Сверхэкспрессия PTEN у мышей приводит к синаптической депрессии схожей с той, что вызывает A β , который также вызывает PDZ-зависимое перемещение PTEN в постсинаптический компартмент, что, вероятно, представляет собой ключевой механизм синаптической токсичности A β и когнитивных нарушений [150]. С другой стороны, ингибирование PTEN восстанавливает нормальные синаптические функции в клеточных и животных моделях БА [150–153].

Рецептор 5-HT $_4$ способен задействовать различные сигнальные пути, в основном зависящие от G $_s$ - и G $_{13}$ -белков, однако для него также показано вовлечение в G $_q$ - и G $_i$ -зависимую передачу сигнала [154, 155]. Кроме того, 5-HT $_4$ -рецептор способен стимулировать ERK1/2- и β -аррестин-независимые механизмы, требующие активации тирозинкиназы Src, конститутивно ассоциированной с 5-HT $_4$ -рецептором (рис. 2) [156]. В 2012 г. Dhawan и Combs [157] показали, что ингибиро-

вание активности киназы Src ослабляет связанный с A β микроглиоз в модели БА на мышах. Также уже упоминаются клинические испытания препарата саракатиниб (небольшой молекулярный ингибитор с высокой эффективностью в отношении киназ Src и Fyn) для лечения БА [158]. Рецептор 5-HT $_4$ также взаимодействует с α -секретазой ADAM10, которая уже упоминалась выше в контексте регулирующего ее белка SAP97. Взаимодействие рецептора 5-HT $_4$ и ADAM10, вероятно, является важным этапом в конститутивной активации неамилоидогенного расщепления APP и высвобождения растворимых фрагментов sAPP α (рис. 2) [159]. Сам по себе sAPP α , как уже было сказано выше, обладает нейротрофическими и нейропротекторными свойствами, а его высвобождение при конститутивной или агонист-зависимой активации 5-HT $_4$ -рецептора вносит определенный вклад в снижение патологических проявлений, вызванных A β в моделях БА на мышах [159, 160]. Кроме того, ADAM10 способна расщеплять белковые субстраты, вовлеченные в патогенез БА, например, белки, участвующие в формировании синапсов и в передаче сигнала по аксонам [161].

В патогенезе БА, наряду с вышеописанными GIP, выделяют также киназу-5 рецептора, связанного с G-белком (GRK5, G-protein coupled receptor kinase-5), взаимодействующую с терминальным концом 5-HT $_4$ -рецептора и подавляющую ERK1/2-путь и активацию Src-киназы (рис. 2) [162]. Было показано, что дефицит GRK5 связан с ранней стадией БА у людей и в моделях заболевания на мышах, а у старых мышей с нокаутом *Grk5* наблюдалось избирательное нарушение рабочей памяти [163] и повышение в гиппокампе как гиперфосфорилирования тау-белка, так и активности GSK-3 β -киназы, которая участвует в его фосфорилировании [164]. Дефицит GRK5 также способствует возникновению «порочного круга» для дальнейшего увеличения накопления A β , что усугубляет воспалительные процессы, возникающие в ЦНС [165]. Рядом работ показано, что GRK5 регулирует активность GSK-3 β и сама способна фосфорилировать тау-белок *in vitro* (рис. 2). Однако, независимо от изменения уровня GRK5, гиперфосфорилирование тау-белка остается сниженным после ингибирования активности GSK-3 β , что позволяет сделать вывод о специфическом влиянии GRK5-киназы на гиперфосфорилирование тау-белка через модуляцию активности GSK-3 β [164, 166, 167].

Отдельного упоминания заслуживает белок-медиатор ответа коллапсина-2 (CRMR2,

collapsin response mediator protein 2), который поразительно схож с тау-белком и имеет такое же отношение к БА (рис. 2). Как и тау-белок, CRMR2 принимает непосредственное участие в регуляции нейрональной архитектуры. Он также ассоциирован с микротрубочками и регулирует их стабильность, на него действуют те же киназы, и он аналогично может собираться в НФК, способные образовывать комплексы с критическими факторами стабилизации синапсов [168–170]. Большое количество научных коллективов подтверждают определенный вклад гиперфосфорилированного CRMR2 (при участии киназ CDK5 и GSK-3 β) в патогенез БА и предлагают различные подходы по снижению уровня фосфорилирования этого белка [170–175]. Примечательно, что С-конец 5-НТ₄-рецептора содержит определенные последовательности для взаимодействия с CRMR2 без вовлечения PDZ-зависимых механизмов [176]. В клетках нейробластомы рецепторы 5-НТ₄ вызывают G₁₃- и RhoA-зависимое укорочение нейритов и округление клеток, что может вносить определенный вклад в регуляцию нейрональной архитектуры, учитывая их взаимодействие с CRMR2 [177].

Последними из 5-НТ-рецепторов, GIP которых играют вероятную роль в этиопатогенезе БА, являются рецепторы 5-НТ₆ и 5-НТ₇, оба связанные с G_s-белком и повышающие уровень сАМР при активации. Для обоих рецепторов показана конститутивная функция, связанная с CDK5, которая участвует в контроле динамики актинового цитоскелета, миграции нейронов, росте нейритов, морфогенезе синапсов, фосфорилируя необходимые для этого белки (рис. 2) [38, 178]. Ингибиторы CDK5 снижают плотность дендритных шипиков, число которых увеличивается после активации 5-НТ₇-рецептора [111]. CDK5 все чаще становится мишенью для воздействия при БА [179–181]. Тот факт, что CDK5 играет важную роль в гиперфосфорилировании тау-белка, может указывать на вовлеченность рецепторов 5-НТ₇ в регуляцию фосфорилирования и агрегации тау-белка при БА. Эта мысль была развита и подтверждена Labus et al. [38], которые на клеточных и животных моделях показали, что конститутивная активация 5-НТ₇-рецепторов приводит, во-первых, к увеличенной активности CDK5 и, во-вторых, к избыточному фосфорилированию тау-белка с дальнейшим формированием белковых агрегатов. Напротив, ингибирование активности 5-НТ₇-рецепторов при помощи антагонистов приводит к устранению данного эффекта.

При этом нокдаун гена *Htr7* (ген, кодирующий рецептор 5-НТ₇) устраняет нарушения памяти у мышей со сверхэкспрессией мутантной формы тау-белка Tau(R406W), склонной к агрегации. Также авторы сообщили, что на работу CDK5 способна влиять конститутивная активность 5-НТ₇-рецепторов, которые образуют с CDK5 белковые комплексы: в клетках, экспрессирующих 5-НТ₇-рецепторы, наблюдается увеличенная активность CDK5 и избыточное фосфорилирование тау-белка по сравнению с клетками без рецептора. В свою очередь, ингибирование активности рецепторов 5-НТ₇ специфическими лигандами приводило к устранению данного эффекта [38]. На связь 5-НТ₇-рецепторов с нейродегенерацией при БА может указывать также то, что они локализируются в структурах, которые в первую очередь подвержены атрофии у пациентов с БА [6]. Примечательно, что уровень экспрессии 5-НТ₇-рецепторов во фронтальной коре и в таламусе, как и уровень 5-НТ в гиппокампе и миндалине, у пациентов с БА снижен по сравнению со здоровыми людьми [112]. Полногеномный скрининг ассоциаций выявил некоторые однонуклеотидные полиморфизмы, расположенные в непосредственной близости от гена *HTR7* у пациентов с БА [38].

Примечательно, что для CDK5 показана экспрессия во многих тканях, однако ее активатор p35, который также является GIP для 5-НТ₆-рецептора и может взаимодействовать с его С-концом [178], присутствует только в нейронах и при воздействии кальпаина расщепляется до p25, который приводит к патологическому каскаду гиперфосфорилирования тау-белка [26, 43]. Прямое ингибирование CDK5 или комплекса p35/CDK5, как показывают несколько исследований, защищает нейроны от гиперфосфорилирования тау-белка [153, 182].

Стоит также отметить еще несколько GIP для этих двух рецепторов: Fyn — для 5-НТ₆-рецептора и белок S100B — для 5-НТ₇-рецептора (рис. 2). Известно, что Fyn-киназа связывается с С-концом 5-НТ₆-рецептора и повышает опосредованную G-белком передачу сигнала. С другой стороны, активация 5-НТ₆-рецептора запускает фосфорилирование Fyn-киназы, что вносит вклад в активацию сигнального пути ERK1/2 [183]. Опосредованная 5-НТ₆-рецептором активация Fyn-киназы регулирует FAK-киназу, вовлеченную в поддержание нормального развития астроглии, роста нейритов, передачи сигналов между клетками и общей структурной целостности клеток [184]. При БА Fyn-киназа индуцирует преждевременную ги-

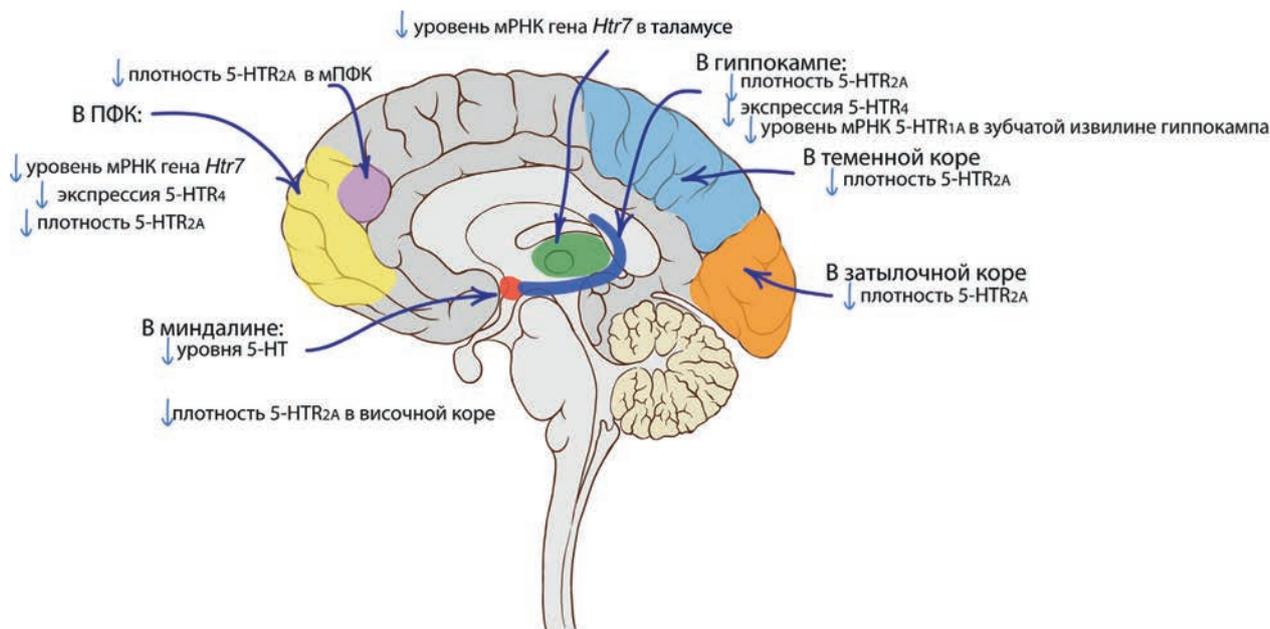


Рис. 3. Изменение ключевых элементов серотониновой системы мозга при БА. 5-HT_{1A} — рецептор 5-НТ_{1A}; 5-HT_{2A} — рецептор 5-НТ_{2A}; 5-HT₄ — рецептор 5-НТ₄

бель нейронов и синапсотоксичность [185], принимает участие в гиперфосфорилировании тау-белка [186–188], играет роль в регуляции продукции Аβ и опосредует Аβ-индуцированную нейротоксичность [187]. В связи с этим большое количество работ указывают на то, что ингибирование Gyn-киназы может быть полезно при лечении БА [158, 187, 189–191].

Белок S100B связывается с 5-НТ₇-рецептором через участки на третьей внутриклеточной петле и негативно влияет на продукцию cAMP, индуцируемую этим рецептором [192]. В совокупности функционирование S100B обеспечивает развитие и созревание мозга млекопитающих, однако его длительное или обширное воздействие может привести к нейродегенерации. Две важные функции S100B в этом отношении — его роль в развитии и пластичности 5-НТ-системы мозга и его роль в каскаде глимальных изменений, связанных с нейровоспалением [193]. Также S100B играет роль в связывании кальция и в основном присутствует в астроцитах (которые также признаются задействованными в патогенезе БА), о чем говорит большинство работ, направленных на исследование S100B в качестве мишени для терапии БА [193–197].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, множество фармакологических, биохимических и молекулярно-биологических данных указывают на то, что цен-

тральная 5-НТ-система мозга играет важную роль в механизмах развития БА и вызываемых ею когнитивных и поведенческих патологий. Комплексный анализ этих данных позволяет выявить ключевые рецепторы и опосредованные ими сигнальные пути, оказывающие влияние на патологическое агрегирование Аβ и тау-белка (рис. 2). Многочисленные работы указывают на то, что определенные воздействия на отдельные типы 5-НТ-рецепторов и/или связанные с ними внутриклеточные сигнальные трансдукторы и сигнальные каскады могут препятствовать формированию патологических агрегатов Аβ и тау-белка, являющихся основными гистопатологическими признаками заболевания и причиной гибели клеток мозга страдающих БА людей. На сегодняшний день среди 5-НТ-рецепторов наиболее перспективными в плане использования в качестве мишеней для коррекции тау- и амилоидопатий представляются 5-НТ₇-рецепторы, поскольку недавними работами показано вовлечение этих рецепторов в механизмы, лежащие в основе формирования патологических агрегатов Аβ и тау-белка, посредством взаимодействия рецепторов с киназой CDK5, играющей существенную роль в развитии БА. С другой стороны, 5-НТ₆-рецепторы связаны с Gyn-киназой, также принимающей участие в механизмах развития заболевания, а сигнальные каскады рецепторов 5-НТ_{1A} и 5-НТ_{2A} вовлекают α- и β-секретазы, имеющие решающее значение в формировании агрегатов Аβ.

Примечательно также существенное снижение функциональной активности 5-HT-системы как в мозге пациентов, страдающих БА, так и в животных моделях заболевания, отражающееся в снижении экспрессии ключевых генов 5-HT-системы и уровня метаболизма самого нейротрансмиттера (рис. 3). Дегенерация 5-HT-системы, несомненно, играет важную роль в связанных с БА когнитивных и поведенческих нарушениях. Однако, принимая во внимание роль 5-HT-системы мозга в модуляции морфогенеза головного мозга, а также в процессах миграции, пролиферации, дифференцировки, созревании и программируемой гибели нейронов [198], можно предположить, что снижение 5-HT-нейротрансмиссии может являться одной из причин развития патологической агрегации A β и тау-белка.

Вклад авторов. Д.В. Еремин – написание статьи, редактирование текста; Е.М. Кондаурова – написание статьи, редактирование текста; А.Я. Родный – создание рисунков, описание внутриклеточных механизмов; К.А. Молобекова – написание статьи; Д.А. Кудлай – редактирование текста; В.С. Науменко – общее руководство, редактирование текста, получение финансирования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011).

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. Querfurth, H. W., and LaFerla, F. M. (2010) Alzheimer's disease, *New Eng. J. Med.*, **362**, 329-344, doi: 10.1056/NEJMra0909142.
2. Selkoe, D. J. (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies, *Ann. Int. Med.*, **140**, 627-638, doi: 10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00047.
3. Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., and Nair, M. (2019) Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics, *Int. J. Nanomed.*, **14**, 5541-5554, doi: 10.2147/IJN.S200490.
4. Cacace, R., Sleegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2016) Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited, *Alzheimers Dement.*, **12**, 733-748, doi: 10.1016/j.jalz.2016.01.012.
5. Bettens, K., Sleegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2010) Current status on Alzheimer's disease molecular genetics: from past, to present, to future, *Human Mol. Genet.*, **19**, R4-R11, doi: 10.1093/hmg/ddq142.
6. Atri, A., Goldfarb, D., Sheard, S., and Shaughnessy, L. (2019) Current and emerging solutions to challenges in the management of Alzheimer's disease, *J. Clin. Psychiatry*, **80**, 6, doi: 10.4088/JCP.MS18002AH3C.
7. Pollock, N. J., Mirra, S. S., Binder, L. I., Hansen, L. A., and Wood, J. G. (1986) Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau, *Lancet*, **2**, 1211, doi: 10.1016/s0140-6736(86)92212-9.
8. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4913-4917, doi: 10.1073/pnas.83.13.4913.
9. Kosik, K. S., Joachim, C. L., and Selkoe, D. J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4044-4048, doi: 10.1073/pnas.83.11.4044.
10. Brion, J. P., Couck, A. M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study, *J. Submicrosc. Cytol.*, **17**, 89-96.
11. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1131-1135, doi: 10.1016/0006-291x(84)91209-9.
12. Quiedeville, A., Boulouard, M., Hamidouche, K., Da Silva Costa-Aze, V., Nee, G., Rochais, C., Dallemagne, P., Fabis, F., Freret, T., and Bouet, V. (2015) Chronic activation of 5-HT₄ receptors or blockade of 5-HT₆ receptors improve memory performances, *Behav. Brain Res.*, **293**, 10-17, doi: 10.1016/j.bbr.2015.07.020.
13. Jahreis, K., Bruge, A., Borsdorf, S., Muller, F. E., Sun, W., Jia, S., Kang, D. M., Boesen, N., Shin, S., Lim, S., Koroleva, A., Satala, G., Bojarski, A. J., Rakusa, E., Fink, A., Doblhammer-Reiter, G., Kim, Y. K., Dityatev, A., Ponimaskin, E., and Labus, J. (2023) Amisulpride as a potential disease-modifying drug in the treatment of tauopathies, *Alzheimers Dement.*, doi: 10.1002/alz.13090.
14. Kucwaj-Brysz, K., Baltrukevich, H., Czarnota, K., and Handzlik, J. (2021) Chemical update on the potential for serotonin 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor agents in the

- treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **49**, 128275, doi: 10.1016/j.bmcl.2021.128275.
15. Paroni, G., Bisceglia, P., and Seripa, D. (2019) Understanding the amyloid hypothesis in Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **68**, 493-510, doi: 10.3233/JAD-180802.
 16. Kametani, F., and Hasegawa, M. (2018) Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **12**, 25, doi: 10.3389/fnins.2018.00025.
 17. Ricciarelli, R., and Fedele, E. (2017) The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind, *Curr. Neuropharmacol.*, **15**, 926-935, doi: 10.2174/1570159X15666170116143743.
 18. Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 595-608, doi: 10.15252/emmm.201606210.
 19. Zhang, H., and Zheng, Y. (2019) β amyloid hypothesis in Alzheimer's disease: pathogenesis, prevention, and management, *Acad. Med. Sin.*, **41**, 702-708, doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.10875.
 20. Jang, S. S., and Chung, H. J. (2016) Emerging link between Alzheimer's disease and homeostatic synaptic plasticity, *Neural Plasticity*, **2016**, 7969272, doi: 10.1155/2016/7969272.
 21. Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S. J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizzati, A., Chouraki, V., Martin, E. R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K. L., Moreno-Grau, S., Olaso, R., et al. (2019) Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing, *Nat. Genet.*, **51**, 414-430, doi: 10.1038/s41588-019-0358-2.
 22. Bis, J. C., Jian, X., Kunkle, B. W., Chen, Y., Hamilton-Nelson, K. L., Bush, W. S., Salerno, W. J., Lancour, D., Ma, Y., Renton, A. E., Marcora, E., Farrell, J. J., Zhao, Y., Qu, L., Ahmad, S., Amin, N., Amouyel, P., Beecham, G. W., Below, J. E., Campion, D., et al. (2020) Whole exome sequencing study identifies novel rare and common Alzheimer's-Associated variants involved in immune response and transcriptional regulation, *Mol. Psychiatry*, **25**, 1859-1875, doi: 10.1038/s41380-018-0112-7.
 23. Kumar, D. K., Choi, S. H., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L. E., Tanzi, R. E., and Moir, R. D. (2016) Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease, *Sci. Transl. Med.*, **8**, 340ra372, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf1059.
 24. Li, N. M., Liu, K. F., Qiu, Y. J., Zhang, H. H., Nakanishi, H., and Qing, H. (2019) Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis, *Neural Regener. Res.*, **14**, 658-665, doi: 10.4103/1673-5374.247469.
 25. Tcw, J., and Goate, A. M. (2017) Genetics of β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **7**, a024539, doi: 10.1101/cshperspect.a024539.
 26. Maitra, S., and Vincent, B. (2022) Cdk5-p25 as a key element linking amyloid and tau pathologies in Alzheimer's disease: mechanisms and possible therapeutic interventions, *Life Sci.*, **308**, 120986, doi: 10.1016/j.lfs.2022.120986.
 27. Breijyeh, Z., and Karaman, R. (2020) Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment, *Molecules*, **25**, 5789, doi: 10.3390/molecules25245789.
 28. Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol. Rev.*, **84**, 361-384, doi: 10.1152/physrev.00024.2003.
 29. Jouanne, M., Rault, S., and Voisin-Chiret, A. S. (2017) Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: an attractive target for the development of novel therapeutic agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **139**, 153-167, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.070.
 30. Ganguly, P., Do, T. D., Larini, L., LaPointe, N. E., Sercel, A. J., Shade, M. F., Feinstein, S. C., Bowers, M. T., and Shea, J. E. (2015) Tau assembly: the dominant role of PHF6 (VQIVYK) in microtubule binding region repeat R3, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 4582-4593, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b00175.
 31. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., and Terro, F. (2013) Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 289-309, doi: 10.1016/j.arr.2012.06.003.
 32. Tapia-Rojas, C., Cabezas-Opazo, F., Deaton, C. A., Vergara, E. H., Johnson, G. V. W., and Quintanilla, R. A. (2019) It's all about tau, *Progress Neurobiol.*, **175**, 54-76, doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.12.005.
 33. Ando, K., Oka, M., Ohtake, Y., Hayashishita, M., Shimizu, S., Hisanaga, S., and Iijima, K. M. (2016) Tau phosphorylation at Alzheimer's disease-related Ser356 contributes to tau stabilization when PAR-1/MARK activity is elevated, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 929-934, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.053.
 34. Dickey, C. A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R. M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C. B., Patterson, C., Dickson, D. W., Nahman, N. S. Jr., Hutton, M., Burrows, F., and Petrucelli, L. (2007) The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins, *J. Clin. Invest.*, **117**, 648-658, doi: 10.1172/JCI29715.
 35. Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments, *Biochemistry*, **38**, 3549-3558, doi: 10.1021/bi981874p.

36. Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016) Tau in physiology and pathology, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 5-21, doi: 10.1038/nrn.2015.1.
37. Morsch, R., Simon, W., and Coleman, P. D. (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **58**, 188-197, doi: 10.1097/00005072-199902000-00008.
38. Labus, J., Rohrs, K. F., Ackmann, J., Varbanov, H., Muller, F. E., Jia, S., Jahreis, K., Vollbrecht, A. L., Butzlaff, M., Schill, Y., Guseva, D., Bohm, K., Kaushik, R., Bijata, M., Marin, P., Chaumont-Dubel, S., Zeug, A., Dityatev, A., and Ponimaskin, E. (2021) Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT₇ receptor, *Progr. Neurobiol.*, **197**, 101900, doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101900.
39. Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., and Tolnay, M. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 909-913, doi: 10.1038/ncb1901.
40. Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., and Ripova, D. (2012) Structure and pathology of tau protein in Alzheimer's disease, *Int. J. Alzheimer's Dis.*, **2012**, 731526, doi: 10.1155/2012/731526.
41. Takashima, A., Noguchi, K., Michel, G., Mercken, M., Hoshi, M., Ishiguro, K., and Imahori, K. (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta, *Neurosci. Lett.*, **203**, 33-36, doi: 10.1016/0304-3940(95)12257-5.
42. Costa, L., Tempio, A., Lacivita, E., Leopoldo, M., and Ciranna, L. (2021) Serotonin 5-HT₇ receptors require cyclin-dependent kinase 5 to rescue hippocampal synaptic plasticity in a mouse model of Fragile X syndrome, *Eur. J. Neurosci.*, **54**, 4124-4132, doi: 10.1111/ejn.15246.
43. Shukla, V., Skuntz, S., and Pant, H. C. (2012) Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease, *Arch. Med. Res.*, **43**, 655-662, doi: 10.1016/j.arcmed.2012.10.015.
44. Cruz, J. C., Tseng, H. C., Goldman, J. A., Shih, H., and Tsai, L. H. (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles, *Neuron*, **40**, 471-483, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00627-5.
45. Simic, G., Babic Leko, M., Wray, S., Harrington, C. R., Delalle, I., Jovanov-Milosevic, N., Bazadona, D., Buee, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., Wischik, C. M., and Hof, P. R. (2017) Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease, *Progr. Neurobiol.*, **151**, 101-138, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.04.001.
46. Morgese, M. G., and Trabace, L. (2019) Monoaminergic system modulation in depression and Alzheimer's disease: a new standpoint? *Front. Pharmacol.*, **10**, 483, doi: 10.3389/fphar.2019.00483.
47. Murley, A. G., and Rowe, J. B. (2018) Neurotransmitter deficits from frontotemporal lobar degeneration, *Brain J. Neurol.*, **141**, 1263-1285, doi: 10.1093/brain/awx327.
48. Huey, E. D., Putnam, K. T., and Grafman, J. (2006) A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia, *Neurology*, **66**, 17-22, doi: 10.1212/01.wnl.0000191304.55196.4d.
49. Mufson, E. J., Kelley, C., and Perez, S. E. (2021) Chronic traumatic encephalopathy and the nucleus basalis of Meynert, *Handbook Clin. Neurol.*, **182**, 9-29, doi: 10.1016/B978-0-12-819973-2.00002-2.
50. Vertes, R. P., Fortin, W. J., and Crane, A. M. (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat, *J. Compar. Neurol.*, **407**, 555-582, doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990517)407:4<555::AID-CNE7>3.0.CO;2-E.
51. Vertes, R. P. (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat, *J. Compar. Neurol.*, **313**, 643-668, doi: 10.1002/cne.903130409.
52. Audet, M. A., Descarries, L., and Doucet, G. (1989) Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex, *J. Chem. Neuroanat.*, **2**, 29-44.
53. Rodriguez, J. J., Noristani, H. N., and Verkhatsky, A. (2012) The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease, *Progr. Neurobiol.*, **99**, 15-41, doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.06.010.
54. Jankowska, A., Wesolowska, A., Pawlowski, M., and Chlon-Rzepa, G. (2018) Multi-target-directed ligands affecting serotonergic neurotransmission for Alzheimer's disease therapy: advances in chemical and biological research, *Curr. Med. Chem.*, **25**, 2045-2067, doi: 10.2174/0929867324666170529122802.
55. Tajeddinn, W., Persson, T., Calvo-Garrido, J., Seed Ahmed, M., Maioli, S., Vijayaraghavan, S., Kazokoglu, M. S., Parrado-Fernandez, C., Yoshitake, T., Kehr, J., Francis, P., Winblad, B., Hoglund, K., Cedazo-Minguez, A., and Aarsland, D. (2016) Pharmacological modulations of the serotonergic system in a cell-model of familial Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **53**, 349-361, doi: 10.3233/JAD-160046.
56. Lyness, S. A., Zarow, C., and Chui, H. C. (2003) Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis, *Neurobiol. Aging*, **24**, 1-23, doi: 10.1016/s0197-4580(02)00057-x.
57. Aletrino, M. A., Vogels, O. J., Van Domburg, P. H., and Ten Donkelaar, H. J. (1992) Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **13**, 461-468, doi: 10.1016/0197-4580(92)90073-7.
58. Thomas, A. J., Hendriksen, M., Piggott, M., Ferrier, I. N., Perry, E., Ince, P., and O'Brien, J. T. (2006)

- A study of the serotonin transporter in the prefrontal cortex in late-life depression and Alzheimer's disease with and without depression, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **32**, 296-303, doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00728.x.
59. Palmer, A. M., Francis, P. T., Bowen, D. M., Benton, J. S., Neary, D., Mann, D. M., and Snowden, J. S. (1987) Catecholaminergic neurones assessed ante-mortem in Alzheimer's disease, *Brain Res.*, **414**, 365-375, doi: 10.1016/0006-8993(87)90018-7.
 60. Palmer, A. M., Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Francis, P. T., and Bowen, D. M. (1987) Monoaminergic innervation of the frontal and temporal lobes in Alzheimer's disease, *Brain Res.*, **401**, 231-238, doi: 10.1016/0006-8993(87)91408-9.
 61. Palmer, A. M., Francis, P. T., Benton, J. S., Sims, N. R., Mann, D. M., Neary, D., Snowden, J. S., and Bowen, D. M. (1987) Presynaptic serotonergic dysfunction in patients with Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, **48**, 8-15, doi: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb13120.x.
 62. Tajeddinn, W., Fereshtehnejad, S. M., Seed Ahmed, M., Yoshitake, T., Kehr, J., Shahnaz, T., Milovanovic, M., Behbahani, H., Hoglund, K., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., Jelic, V., Jaremo, P., and Aarsland, D. (2016) Association of platelet serotonin levels in Alzheimer's disease with clinical and cerebrospinal fluid markers, *J. Alzheimer's Dis.*, **53**, 621-630, doi: 10.3233/JAD-160022.
 63. Proksej, T., Jerin, A., Muck-Seler, D., and Kogoj, A. (2014) Decreased platelet serotonin concentration in Alzheimer's disease with involuntary emotional expression disorder, *Neurosci. Lett.*, **578**, 71-74, doi: 10.1016/j.neulet.2014.06.034.
 64. Ehrhardt, S., Porsteinsson, A. P., Munro, C. A., Rosenberg, P. B., Pollock, B. G., Devanand, D. P., Mintzer, J., Rajji, T. K., Ismail, Z., Schneider, L. S., Baksh, S. N., Drye, L. T., Avramopoulos, D., Shade, D. M., Lyketsos, C. G., and Group, S. C. R. (2019) Escitalopram for agitation in Alzheimer's disease (S-CitAD): Methods and design of an investigator-initiated, randomized, controlled, multicenter clinical trial, *Alzheimers Dement.*, **15**, 1427-1436, doi: 10.1016/j.jalz.2019.06.4946.
 65. Porsteinsson, A. P., Keltz, M. A., and Smith, J. S. (2014) Role of citalopram in the treatment of agitation in Alzheimer's disease, *Neurodegener. Dis. Management.*, **4**, 345-349, doi: 10.2217/nmt.14.35.
 66. Porsteinsson, A. P., Drye, L. T., Pollock, B. G., Devanand, D. P., Frangakis, C., Ismail, Z., Marano, C., Meinert, C. L., Mintzer, J. E., Munro, C. A., Pelton, G., Rabins, P. V., Rosenberg, P. B., Schneider, L. S., Shade, D. M., Weintraub, D., Yesavage, J., and Lyketsos, C. G. for the CitAD Research Group (2014) Effect of citalopram on agitation in Alzheimer disease: the CitAD randomized clinical trial, *Jama*, **311**, 682-691, doi: 10.1001/jama.2014.93.
 67. Xie, Y., Liu, P. P., Lian, Y. J., Liu, H. B., and Kang, J. S. (2019) The effect of selective serotonin reuptake inhibitors on cognitive function in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia: focusing on fluoxetine with long follow-up periods, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **4**, 30, doi: 10.1038/s41392-019-0064-7.
 68. Sharp, T., and Barnes, N. M. (2020) Central 5-HT receptors and their function; present and future, *Neuropharmacology*, **177**, 108155, doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108155.
 69. Humphrey, P. P., and Barnard, E. A. (1998) International Union of Pharmacology. XIX. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification system, *Pharmacol. Rev.*, **50**, 271-277.
 70. Pauwels, P. J. (2000) Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors, *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1743-1750, doi: 10.1016/s0006-2952(00)00476-7.
 71. Rojas, P. S., Aguayo, F., Neira, D., Tejos, M., Aliaga, E., Munoz, J. P., Parra, C. S., and Fiedler, J. L. (2017) Dual effect of serotonin on the dendritic growth of cultured hippocampal neurons: Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors, *Mol. Cell. Neurosci.*, **85**, 148-161, doi: 10.1016/j.mcn.2017.09.009.
 72. Papoucheva, E., Dumuis, A., Sebben, M., Richter, D. W., and Ponimaskin, E. G. (2004) The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein, *J. Biol. Chem.*, **279**, 3280-3291, doi: 10.1074/jbc.M308177200.
 73. Barnes, N. M., and Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacology*, **38**, 1083-1152, doi: 10.1016/S0028-3908(99)00010-6.
 74. Albert, P. R., and Vahid-Ansari, F. (2019) The 5-HT_{1A} receptor: signaling to behavior, *Biochimie*, **161**, 34-45, doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.015.
 75. Ogren, S. O., Eriksson, T. M., Elvander-Tottie, E., D'Addario, C., Ekstrom, J. C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J., and Stiedl, O. (2008) The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory, *Behav. Brain Res.*, **195**, 54-77, doi: 10.1016/j.bbr.2008.02.023.
 76. Carhart-Harris, R. L., and Nutt, D. J. (2017) Serotonin and brain function: a tale of two receptors, *J. Psychopharmacol.*, **31**, 1091-1120, doi: 10.1177/0269881117725915.
 77. Verdurand, M., Chauveau, F., Daoust, A., Morel, A. L., Bonnefoi, F., Liger, F., Berod, A., and Zimmer, L. (2016) Differential effects of amyloid-beta 1-40 and 1-42 fibrils on 5-HT_{1A} serotonin receptors in rat brain, *Neurobiol. Aging*, **40**, 11-21, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.12.008.
 78. Verdurand, M., Berod, A., Le Bars, D., and Zimmer, L. (2011) Effects of amyloid-beta peptides on the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the rat hippocampus, *Neurobiol. Aging*, **32**, 103-114, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.008.

79. Afshar, S., Shahidi, S., Rohani, A. H., Komaki, A., and Asl, S. S. (2018) The effect of NAD-299 and TCB-2 on learning and memory, hippocampal BDNF levels and amyloid plaques in Streptozotocin-induced memory deficits in male rats, *Psychopharmacology (Berl)*, **235**, 2809-2822, doi: 10.1007/s00213-018-4973-x.
80. Afshar, S., Shahidi, S., Rohani, A. H., Soleimani Asl, S., and Komaki, A. (2019) Protective effects of 5-HT_{1A} receptor antagonist and 5-HT_{2A} receptor agonist on the biochemical and histological features in a rat model of Alzheimer's disease, *J. Chem. Neuroanat.*, **96**, 140-147, doi: 10.1016/j.jchemneu.2019.01.008.
81. Wang, M., Zong, H. F., Chang, K. W., Han, H., Yasir Rizvi, M., Iffat Neha, S., Li, Z. Y., Yang, W. N., and Qian, Y. H. (2020) 5-HT_{1A}R alleviates A β -induced cognitive decline and neuroinflammation through crosstalk with NF- κ B pathway in mice, *Int. Immunopharmacol.*, **82**, 106354, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106354.
82. Shruster, A., and Offen, D. (2014) Targeting neurogenesis ameliorates danger assessment in a mouse model of Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.*, **261**, 193-201, doi: 10.1016/j.bbr.2013.12.028.
83. Wang, Y. J., Ren, Q. G., Gong, W. G., Wu, D., Tang, X., Li, X. L., Wu, F. F., Bai, F., Xu, L., and Zhang, Z. J. (2016) Escitalopram attenuates beta-amyloid-induced tau hyperphosphorylation in primary hippocampal neurons through the 5-HT_{1A} receptor mediated Akt/GSK-3 β pathway, *Oncotarget*, **7**, 13328-13339, doi: 10.18632/oncotarget.7798.
84. Ren, Q. G., Wang, Y. J., Gong, W. G., Zhou, Q. D., Xu, L., and Zhang, Z. J. (2015) Escitalopram ameliorates forskolin-induced tau hyperphosphorylation in HEK239/tau441 cells, *J. Mol. Neurosci.*, **56**, 500-508, doi: 10.1007/s12031-015-0519-4.
85. Park, Y. S., and Sung, K. W. (2019) Selective serotonin reuptake inhibitor escitalopram inhibits 5-HT₃ receptor currents in NCB-20 cells, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **23**, 509-517, doi: 10.4196/kjpp.2019.23.6.509.
86. Werner, F. M., and Covenas, R. (2016) Serotonergic drugs: agonists/antagonists at specific serotonergic subreceptors for the treatment of cognitive, depressant and psychotic symptoms in Alzheimer's disease, *Curr. Pharmaceut. Design*, **22**, 2064-2071, doi: 10.2174/1381612822666160127113524.
87. Odagaki, Y., Kinoshita, M., Ota, T., Javier Meana, J., Callado, L. F., and Garcia-Sevilla, J. A. (2017) Functional activation of G α_q coupled to 5-HT_{2A} receptor and M₁ muscarinic acetylcholine receptor in postmortem human cortical membranes, *J. Neural Transm.*, **124**, 1123-1133, doi: 10.1007/s00702-017-1749-0.
88. Zifa, E., and Fillion, G. (1992) 5-Hydroxytryptamine receptors, *Pharmacol. Rev.*, **44**, 401-458.
89. Blin, J., Baron, J. C., Dubois, B., Crouzel, C., Fiorelli, M., Attar-Levy, D., Pillon, B., Fournier, D., Vidailhet, M., and Agid, Y. (1993) Loss of brain 5-HT₂ receptors in Alzheimer's disease. In vivo assessment with positron emission tomography and [18F]setoperone, *Brain*, **116**, 497-510, doi: 10.1093/brain/116.3.497.
90. Holm, P., Ettrup, A., Klein, A. B., Santini, M. A., El-Sayed, M., Elvang, A. B., Stensbol, T. B., Mikkelsen, J. D., Knudsen, G. M., and Aznar, S. (2010) Plaque deposition dependent decrease in 5-HT_{2A} serotonin receptor in AbetaPP_{swe}/PS1dE9 amyloid overexpressing mice, *J. Alzheimer's Dis.*, **20**, 1201-1213, doi: 10.3233/JAD-2010-100117.
91. Lai, M. K., Tsang, S. W., Alder, J. T., Keene, J., Hope, T., Esiri, M. M., Francis, P. T., and Chen, C. P. (2005) Loss of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease, *Psychopharmacology (Berl)*, **179**, 673-677, doi: 10.1007/s00213-004-2077-2.
92. Marner, L., Frokjaer, V. G., Kalbitzer, J., Lehel, S., Madsen, K., Baare, W. F., Knudsen, G. M., and Hasselbalch, S. G. (2012) Loss of serotonin 2A receptors exceeds loss of serotonergic projections in early Alzheimer's disease: a combined [11C]DASB and [18F]altanserin-PET study, *Neurobiol. Aging*, **33**, 479-487, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.023.
93. Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H., and Wurtman, R. J. (1996) Serotonin 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion, *J. Biol. Chem.*, **271**, 4188-4194, doi: 10.1074/jbc.271.8.4188.
94. Lu, J., Zhang, C., Lv, J., Zhu, X., Jiang, X., Lu, W., Lu, Y., Tang, Z., Wang, J., and Shen, X. (2021) Antiallergic drug desloratadine as a selective antagonist of 5HT_{2A} receptor ameliorates pathology of Alzheimer's disease model mice by improving microglial dysfunction, *Aging Cell*, **20**, e13286, doi: 10.1111/accel.13286.
95. Busceti, C. L., Di Pietro, P., Rizzo, B., Traficante, A., Biagioni, F., Nistico, R., Fornai, F., Battaglia, G., Nicoletti, F., and Bruno, V. (2015) 5-HT_{2C} serotonin receptor blockade prevents tau protein hyperphosphorylation and corrects the defect in hippocampal synaptic plasticity caused by a combination of environmental stressors in mice, *Pharmacol. Res.*, **99**, 258-268, doi: 10.1016/j.phrs.2015.06.017.
96. Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., and Dumuis, A. (2004) 5-HT₄ receptors, *Curr. Drug Targets*, **3**, 39-51, doi: 10.2174/1568007043482615.
97. Fisher, J. R., Wallace, C. E., Tripoli, D. L., Sheline, Y. I., and Cirrito, J. R. (2016) Redundant Gs-coupled serotonin receptors regulate amyloid-beta metabolism in vivo, *Mol. Neurodegener.*, **11**, 45, doi: 10.1186/s13024-016-0112-5.
98. King, M. V., Marsden, C. A., and Fone, K. C. (2008) A role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory, *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 482-492, doi: 10.1016/j.tips.2008.07.001.

99. Rebholz, H., Friedman, E., and Castello, J. (2018) Alterations of expression of the serotonin 5-HT₄ receptor in brain disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3581, doi: 10.3390/ijms19113581.
100. Madsen, K., Neumann, W. J., Holst, K., Marnier, L., Haahr, M. T., Lehel, S., Knudsen, G. M., and Hasselbalch, S. G. (2011) Cerebral serotonin 4 receptors and amyloid-beta in early Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **26**, 457-466, doi: 10.3233/JAD-2011-110056.
101. Baranger, K., Giannoni, P., Girard, S. D., Girot, S., Gaven, F., Stephan, D., Migliorati, M., Khrestchatsky, M., Bockaert, J., Marchetti-Gauthier, E., Rivera, S., Claeysen, S., and Roman, F. S. (2017) Chronic treatments with a 5-HT₄ receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Neuropharmacology*, **126**, 128-141, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.031.
102. Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., Bouet, V., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert Freon, A., Mignani, S., Cresteil, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C., and Dallemagne, P. (2014) Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E3825-E3830, doi: 10.1073/pnas.1410315111.
103. Lalut, J., Karila, D., Dallemagne, P., and Rochais, C. (2017) Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in Alzheimer's disease treatment, *Fut. Med. Chem.*, **9**, 781-795, doi: 10.4155/fmc-2017-0031.
104. Nirogi, R., Mohammed, A. R., Shinde, A. K., Gagginapally, S. R., Kancharla, D. M., Ravella, S. R., Bogaraju, N., Middekadi, V. R., Subramanian, R., Palacharla, R. C., Benade, V., Muddana, N., Abraham, R., Medapati, R. B., Thenttu, J. B., Mekala, V. R., Petlu, S., Lingavarapu, B. B., Yarra, S., Kagita, N., et al. (2021) Discovery and Preclinical Characterization of Usmarapride (SUVN-D4010): A potent, selective 5-HT₄ receptor partial agonist for the treatment of cognitive deficits associated with Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.*, **64**, 10641-10665, doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00703.
105. Wichur, T., Pasięka, A., Godyn, J., Panek, D., Goral, I., Latacz, G., Honkisz-Orzechowska, E., Bucki, A., Siwek, A., Gluch-Lutwin, M., Knez, D., Brazzolotto, X., Gobec, S., Kolaczowski, M., Sabate, R., Malawska, B., and Wiecowska, A. (2021) Discovery of 1-(phenylsulfonyl)-1H-indole-based multifunctional ligands targeting cholinesterases and 5-HT₆ receptor with anti-aggregation properties against amyloid-beta and tau, *Eur. J. Med. Chem.*, **225**, 113783, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113783.
106. Hashemi-Firouzi, N., Shahidi, S., Soleimani-Asl, S., and Komaki, A. (2018) 5-Hydroxytryptamine receptor 6 antagonist, SB258585 exerts neuroprotection in a rat model of Streptozotocin-induced Alzheimer's disease, *Metab. Brain Dis.*, **33**, 1243-1253, doi: 10.1007/s11011-018-0228-0.
107. Ivachtchenko, A. V., Lavrovsky, Y., and Okun, I. (2016) AVN-101: a multi-target drug candidate for the treatment of CNS disorders, *J. Alzheimer's Dis.*, **53**, 583-620, doi: 10.3233/JAD-151146.
108. Ivachtchenko, A. V., Lavrovsky, Y., and Ivanenkov, Y. A. (2016) AVN-211, novel and highly selective 5-HT₆ receptor small molecule antagonist, for the treatment of Alzheimer's disease, *Mol. Pharmacol.*, **13**, 945-963, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00830.
109. Meneses, A. (2017) Neural activity, memory, and dementias: serotonergic markers, *Behav. Pharmacol.*, **28**, 132-141, doi: 10.1097/FBP.0000000000000279.
110. Crews, L., and Masliah, E. (2010) Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Human Mol. Genet.*, **19**, R12-R20, doi: 10.1093/hmg/ddq160.
111. Lee, J., Avramets, D., Jeon, B., and Choo, H. (2021) Modulation of serotonin receptors in neurodevelopmental disorders: focus on 5-HT₇ receptor, *Molecules*, **26**, 3348, doi: 10.3390/molecules26113348.
112. Solas, M., Van Dam, D., Janssens, J., Ocariz, U., Vermeiren, Y., De Deyn, P. P., and Ramirez, M. J. (2021) 5-HT₇ receptors in Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, **150**, 105185, doi: 10.1016/j.neuint.2021.105185.
113. Hedlund, P. B. (2009) The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview, *Psychopharmacology (Berl)*, **206**, 345-354, doi: 10.1007/s00213-009-1626-0.
114. Naumenko, V. S., Kondaurova, E. M., and Popova, N. K. (2011) On the role of brain 5-HT₇ receptor in the mechanism of hypothermia: comparison with hypothermia mediated via 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptor, *Neuropharmacology*, **61**, 1360-1365, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.022.
115. Rodnyy, A. Y., Kondaurova, E. M., Bazovkina, D. V., Kulikova, E. A., Ilchibaeva, T. V., Kovetskaya, A. I., Baraboshkina, I. A., Bazhenova, E. Y., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2022) Serotonin 5-HT₇ receptor overexpression in the raphe nuclei area produces antidepressive effect and affects brain serotonin system in male mice, *J. Neurosci. Res.*, **100**, 1506-1523, doi: 10.1002/jnr.25055.
116. Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Gorinski, N., Guseva, D., Abdel-Galil, D., Frohlich, M., Doring, F., Wischmeyer, E., Richter, D. W., Neher, E., and Ponimaskin, E. G. (2012) Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking, *J. Cell Sci.*, **125**, 2486-2499, doi: 10.1242/jcs.101337.

117. Naumenko, V. S., Popova, N. K., Lacivita, E., Leopoldo, M., and Ponimaskin, E. G. (2014) Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders, *CNS Neurosci. Ther.*, **20**, 582-590, doi: 10.1111/cns.12247.
118. Speranza, L., Labus, J., Volpicelli, F., Guseva, D., Lacivita, E., Leopoldo, M., Bellenchi, G. C., di Porzio, U., Bijata, M., Perrone-Capano, C., and Ponimaskin, E. (2017) Serotonin 5-HT₇ receptor increases the density of dendritic spines and facilitates synaptogenesis in forebrain neurons, *J. Neurochem.*, **141**, 647-661, doi: 10.1111/jnc.13962.
119. Kvachnina, E., Liu, G., Dityatev, A., Renner, U., Dumuis, A., Richter, D. W., Dityateva, G., Schachner, M., Voyno-Yasnetskaya, T. A., and Ponimaskin, E. G. (2005) 5-HT₇ receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology, *J. Neurosci.*, **25**, 7821-7830, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005.
120. Hashemi-Firouzi, N., Komaki, A., Soleimani Asl, S., and Shahidi, S. (2017) The effects of the 5-HT₇ receptor on hippocampal long-term potentiation and apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease, *Brain Res. Bull.*, **135**, 85-91, doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.10.004.
121. Shahidi, S., Asl, S. S., Komaki, A., and Hashemi-Firouzi, N. (2018) The effect of chronic stimulation of serotonin receptor type 7 on recognition, passive avoidance memory, hippocampal long-term potentiation, and neuronal apoptosis in the amyloid beta protein treated rat, *Psychopharmacology (Berl)*, **235**, 1513-1525, doi: 10.1007/s00213-018-4862-3.
122. Quintero-Villegas, A., and Valdes-Ferrer, S. I. (2019) Role of 5-HT₇ receptors in the immune system in health and disease, *Mol. Med.*, **26**, 2, doi: 10.1186/s10020-019-0126-x.
123. Quintero-Villegas, A., and Valdes-Ferrer, S. I. (2022) Central nervous system effects of 5-HT₇ receptors: a potential target for neurodegenerative diseases, *Mol. Med.*, **28**, 70, doi: 10.1186/s10020-022-00497-2.
124. Cadirci, E., Halici, Z., Bayir, Y., Albayrak, A., Karakus, E., Polat, B., Unal, D., Atamanalp, S. S., Aksak, S., and Gundogdu, C. (2013) Peripheral 5-HT₇ receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats, *Immunobiology*, **218**, 1271-1283, doi: 10.1016/j.imbio.2013.04.012.
125. Ong, Q., Guo, S., Duan, L., Zhang, K., Collier, E. A., and Cui, B. (2016) The timing of Raf/ERK and AKT activation in protecting PC12 cells against oxidative stress, *PLoS One*, **11**, e0153487, doi: 10.1371/journal.pone.0153487.
126. Barnes, N. M., Ahern, G. P., Becamel, C., Bockaert, J., Camilleri, M., Chaumont-Dubel, S., Claeyssen, S., Cunningham, K. A., Fone, K. C., Gershon, M., Di Giovanni, G., Goodfellow, N. M., Halberstadt, A. L., Hartley, R. M., Hassaine, G., Herrick-Davis, K., Hovius, R., Lacivita, E., Lambe, E. K., Leopoldo, M., et al. (2021) International union of basic and clinical pharmacology. CX. Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine; pharmacology and function, *Pharmacol. Rev.*, **73**, 310-520, doi: 10.1124/pr.118.015552.
127. Khachaturian, Z. S. (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging, *Ann. NY Acad. Sci.*, **747**, 1-11, doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb44398.x.
128. O'Day, D. H. (2019) Alzheimer's disease: a short introduction to the calmodulin hypothesis, *AIMS Neurosci.*, **6**, 231-239, doi: 10.3934/Neuroscience.2019.4.231.
129. Chavez, S. E., and O'Day, D. H. (2007) Calmodulin binds to and regulates the activity of beta-secretase (BACE1), in *Current Research on Alzheimers Disease*, Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, NY, pp. 37-47.
130. Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L., and Klein, W. L. (2018) The amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade, *J. Alzheimer's Dis.*, **64**, S567-S610, doi: 10.3233/JAD-179941.
131. Padilla, R., Maccioni, R. B., and Avila, J. (1990) Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein tau, *Mol. Cell. Biochem.*, **97**, 35-41, doi: 10.1007/BF00231699.
132. Lee, Y. C., and Wolff, J. (1984) Calmodulin binds to both microtubule-associated protein 2 and tau proteins, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1226-1230, doi: 10.1016/S0021-9258(17)43592-7.
133. Ghosh, A., and Giese, K. P. (2015) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer's disease, *Mol. Brain*, **8**, 78, doi: 10.1186/s13041-015-0166-2.
134. O'Day, D. H., Eshak, K., and Myre, M. A. (2015) Calmodulin binding proteins and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **46**, 553-569, doi: 10.3233/JAD-142772.
135. Reese, L. C., and Tagliatalata, G. (2011) A role for calcineurin in Alzheimer's disease, *Current neuropharmacology*, **9**, 685-692, doi: 10.2174/157015911798376316.
136. Turner, J. H., Gelasco, A. K., and Raymond, J. R. (2004) Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, **279**, 17027-17037, doi: 10.1074/jbc.M313919200.
137. Della Rocca, G. J., Mukhin, Y. V., Garnovskaya, M. N., Daaka, Y., Clark, G. J., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Raymond, J. R. (1999) Serotonin 5-HT_{1A} receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis, *J. Biol. Chem.*, **274**, 4749-4753, doi: 10.1074/jbc.274.8.4749.

138. Turner, J. H., and Raymond, J. R. (2005) Interaction of calmodulin with the serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, **280**, 30741-30750, doi: 10.1074/jbc.M501696200.
139. Becamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lubbert, H., and Ullmer, C. (2001) Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1, *J. Biol. Chem.*, **276**, 12974-12982, doi: 10.1074/jbc.M008089200.
140. Becamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galeotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J., and Marin, P. (2004) The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins, *J. Biol. Chem.*, **279**, 20257-20266, doi: 10.1074/jbc.M312106200.
141. Bustos, F. J., Ampuero, E., Jury, N., Aguilar, R., Falahi, F., Toledo, J., Ahumada, J., Lata, J., Cubillos, P., Henriquez, B., Guerra, M. V., Stehberg, J., Neve, R. L., Inestrosa, N. C., Wyneken, U., Fuenzalida, M., Hartel, S., Sena-Esteves, M., Varela-Nallar, L., Rots, M. G., et al. (2017) Epigenetic editing of the Dlg4/PSD95 gene improves cognition in aged and Alzheimer's disease mice, *Brain*, **140**, 3252-3268, doi: 10.1093/brain/awx272.
142. Kamat, P. K., Kyles, P., Kalani, A., and Tyagi, N. (2016) Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced Alzheimer's disease-like pathology, blood-brain barrier disruption, and synaptic disorder, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 2451-2467, doi: 10.1007/s12035-015-9212-4.
143. Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S. A., and Xu, H. (2014) Oligomeric Aβ-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.*, **9**, 48, doi: 10.1186/1750-1326-9-48.
144. Savioz, A., Leuba, G., and Vallet, P. G. (2014) A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease, *Ageing Res. Rev.*, **18**, 86-94, doi: 10.1016/j.arr.2014.09.004.
145. Dore, K., Carrico, Z., Alfonso, S., Marino, M., Koymans, K., Kessels, H. W., and Malinow, R. (2021) PSD-95 protects synapses from β-amyloid, *Cell Rep.*, **35**, 109194, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109194.
146. Saraceno, C., Marcello, E., Di Marino, D., Borroni, B., Claeysen, S., Perroy, J., Padovani, A., Tramontano, A., Gardoni, F., and Di Luca, M. (2014) SAP97-mediated ADAM10 trafficking from Golgi outposts depends on PKC phosphorylation, *Cell Death Dis.*, **5**, e1547, doi: 10.1038/cddis.2014.492.
147. Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A., and Di Luca, M. (2007) Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity, *J. Neurosci.*, **27**, 1682-1691, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3439-06.2007.
148. Grolla, A. A., Fakhfour, G., Balzaretto, G., Marcello, E., Gardoni, F., Canonico, P. L., DiLuca, M., Genazzani, A. A., and Lim, D. (2013) Aβ leads to Ca²⁺ signaling alterations and transcriptional changes in glial cells, *Neurobiol. Aging*, **34**, 511-522, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.005.
149. Ji, S. P., Zhang, Y., Van Cleemput, J., Jiang, W., Liao, M., Li, L., Wan, Q., Backstrom, J. R., and Zhang, X. (2006) Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse, *Nat. Med.*, **12**, 324-329, doi: 10.1038/nm1349.
150. Knafo, S., Sanchez-Puelles, C., Palomer, E., Delgado, I., Draffin, J. E., Mingo, J., Wahle, T., Kaleka, K., Mou, L., Pereda-Perez, I., Klosi, E., Faber, E. B., Chapman, H. M., Lozano-Montes, L., Ortega-Molina, A., Ordonez-Gutierrez, L., Wandosell, F., Vina, J., Dotti, C. G., Hall, R. A., et al. (2016) PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models, *Nat. Neurosci.*, **19**, 443-453, doi: 10.1038/nn.4225.
151. Cao, F., Liu, Z., and Sun, G. (2020) Diagnostic value of miR-193a-3p in Alzheimer's disease and miR-193a-3p attenuates amyloid-beta induced neurotoxicity by targeting PTEN, *Exp. Gerontol.*, **130**, 110814, doi: 10.1016/j.exger.2019.110814.
152. Cui, W., Wang, S., Wang, Z., Wang, Z., Sun, C., and Zhang, Y. (2017) Inhibition of PTEN attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis via activation of PI3K/AKT pathway in Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.*, **42**, 3052-3060, doi: 10.1007/s11064-017-2338-1.
153. Zeng, L., Jiang, H., Ashraf, G. M., Liu, J., Wang, L., Zhao, K., Liu, M., Li, Z., and Liu, R. (2022) Implications of miR-148a-3p/p35/PTEN signaling in tau hyperphosphorylation and autoregulatory feedforward of Akt/CREB in Alzheimer's disease, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **27**, 256-275, doi: 10.1016/j.omtn.2021.11.019.
154. Coupar, I. M., Desmond, P. V., and Irving, H. R. (2007) Human 5-HT₄ and 5-HT₇ receptor splice variants: are they important? *Curr. Neuropharmacol.*, **5**, 224-231, doi: 10.2174/157015907782793621.
155. Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., and Dumuis, A. (2008) 5-HT₄ receptors: history, molecular pharmacology and brain functions, *Neuropharmacology*, **55**, 922-931, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.013.
156. Gill, R. K., Saksena, S., Tyagi, S., Alrefai, W. A., Malakooti, J., Sarwar, Z., Turner, J. R., Ramaswamy, K., and Dudeja, P. K. (2005) Serotonin inhibits Na⁺/H⁺ exchange activity via 5-HT₄ receptors and activation of PKC alpha in human intestinal epithelial cells, *Gastroenterology*, **128**, 962-974, doi: 10.1053/j.gastro.2005.02.011.

157. Dhawan, G., and Combs, C. K. (2012) Inhibition of Src kinase activity attenuates amyloid associated microgliosis in a murine model of Alzheimer's disease, *J. Neuroinflamm.*, **9**, 117, doi: 10.1186/1742-2094-9-117.
158. Nygaard, H. B., van Dyck, C. H., and Strittmatter, S. M. (2014) Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease, *Alzheimers Res. Ther.*, **6**, 8, doi: 10.1186/alzrt238.
159. Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., Dumuis, A., and Claeysen, S. (2013) 5-HT₄ receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10, *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 130-140, doi: 10.1021/cn300095t.
160. Tesseur, I., Pimenova, A. A., Lo, A. C., Ciesielska, M., Lichtenthaler, S. F., De Maeyer, J. H., Schuurkes, J. A., D'Hooge, R., and De Strooper, B. (2013) Chronic 5-HT₄ receptor activation decreases A β production and deposition in hAPP/PS1 mice, *Neurobiol. Aging*, **34**, 1779-1789, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.01.020.
161. Marcello, E., Borroni, B., Pelucchi, S., Gardoni, F., and Di Luca, M. (2017) ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease, *Expert Opin. Ther. Targets*, **21**, 1017-1026, doi: 10.1080/14728222.2017.1386176.
162. Teixeira, J. P., and Ramalho, T. C. (2021) Regulation of protein synthesis: an approach to treat autism spectrum disorder (ASD), *Curr. Med. Chem.*, **28**, 7141-7156, doi: 10.2174/0929867328666210419125634.
163. Suo, Z., Cox, A. A., Bartelli, N., Rasul, I., Festoff, B. W., Premont, R. T., and Arendash, G. W. (2007) GRK5 deficiency leads to early Alzheimer-like pathology and working memory impairment, *Neurobiol. Aging*, **28**, 1873-1888, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.013.
164. Zhao, J., Li, X., Chen, X., Cai, Y., Wang, Y., Sun, W., Mai, H., Yang, J., Fan, W., Tang, P., Ou, M., Zhang, Y., Huang, X., Zhao, B., and Cui, L. (2019) GRK5 influences the phosphorylation of tau via GSK3 β and contributes to Alzheimer's disease, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 10411-10420, doi: 10.1002/jcp.27709.
165. Suo, W. Z., and Li, L. (2010) Dysfunction of G protein-coupled receptor kinases in Alzheimer's disease, *ScientificWorldJournal*, **10**, 1667-1678, doi: 10.1100/tsw.2010.154.
166. Zhang, Y., Zhao, J., Yin, M., Cai, Y., Liu, S., Wang, Y., Zhang, X., Cao, H., Chen, T., Huang, P., Mai, H., Liu, Z., Tao, H., Zhao, B., and Cui, L. (2017) The influence of two functional genetic variants of GRK5 on tau phosphorylation and their association with Alzheimer's disease risk, *Oncotarget*, **8**, 72714-72726, doi: 10.18632/oncotarget.20283.
167. Zhang, Y., Chen, L., Shen, G., Zhao, Q., Shang-guan, L., and He, M. (2014) GRK5 dysfunction accelerates tau hyperphosphorylation in APP (swe) mice through impaired cholinergic activity, *Neuroreport*, **25**, 542-547, doi: 10.1097/WNR.000000000000142.
168. Dudova, I., Horackova, K., Hrdlicka, M., and Balastik, M. (2020) Can maternal autoantibodies play an etiological role in ASD development? *Neuropsych. Dis. Treatment*, **16**, 1391-1398, doi: 10.2147/NDT.S239504.
169. Ziak, J., Weissova, R., Jerabkova, K., Janikova, M., Maimon, R., Petrsek, T., Pukajova, B., Kleisnerova, M., Wang, M., Brill, M. S., Kasperek, P., Zhou, X., Alvarez-Bolado, G., Sedlacek, R., Miggeld, T., Stuchlik, A., Perlson, E., and Balastik, M. (2020) CRMP2 mediates Sema3F-dependent axon pruning and dendritic spine remodeling, *EMBO Rep.*, **21**, e48512, doi: 10.15252/embr.201948512.
170. Hensley, K., and Kursula, P. (2016) Collapsin response mediator protein-2 (CRMP2) is a plausible etiological factor and potential therapeutic target in Alzheimer's disease: comparison and contrast with microtubule-associated protein Tau, *J. Alzheimer's Dis.*, **53**, 1-14, doi: 10.3233/JAD-160076.
171. Brustovetsky, T., Khanna, R., and Brustovetsky, N. (2023) CRMP2 participates in regulating mitochondrial morphology and motility in Alzheimer's disease, *Cells*, **12**, 1287, doi: 10.3390/cells12091287.
172. Lawal, M. F., Olotu, F. A., Agoni, C., and Soliman, M. E. (2018) Exploring the C-terminal tail dynamics: structural and molecular perspectives into the therapeutic activities of novel CRMP-2 inhibitors, naringenin and Naringenin-7-O-glucuronide, in the treatment of Alzheimer's disease, *Chem. Biodivers.*, **15**, e1800437, doi: 10.1002/cbdv.201800437.
173. Lawal, M., Olotu, F. A., and Soliman, M. E. S. (2018) Across the blood-brain barrier: Neurotherapeutic screening and characterization of naringenin as a novel CRMP-2 inhibitor in the treatment of Alzheimer's disease using bioinformatics and computational tools, *Comput. Biol. Med.*, **98**, 168-177, doi: 10.1016/j.compbiomed.2018.05.012.
174. Williamson, R., van Aalten, L., Mann, D. M., Platt, B., Plattner, F., Bedford, L., Mayer, J., Howlett, D., Usardi, A., Sutherland, C., and Cole, A. R. (2011) CRMP2 hyperphosphorylation is characteristic of Alzheimer's disease and not a feature common to other neurodegenerative diseases, *J. Alzheimer's Dis.*, **27**, 615-625, doi: 10.3233/JAD-2011-110617.
175. Soutar, M. P., Thornhill, P., Cole, A. R., and Sutherland, C. (2009) Increased CRMP2 phosphorylation is observed in Alzheimer's disease; does this tell us anything about disease development? *Curr. Alzheimer Res.*, **6**, 269-278, doi: 10.2174/156720509788486572.
176. Joubert, L., Hanson, B., Barthet, G., Sebben, M., Claeysen, S., Hong, W., Marin, P., Dumuis, A., and

- Bockaert, J. (2004) New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT_{4a} receptor splice variant: roles in receptor targeting, *J. Cell Sci.*, **117**, 5367-5379, doi: 10.1242/jcs.01379.
177. Ponimaskin, E. G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D. W., and Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2002) 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20812-20819, doi: 10.1074/jbc.M112216200.
178. Duhr, F., Deleris, P., Raynaud, F., Seveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury la Cour, C., Millan, M. J., Bockaert, J., Marin, P., and Chaumont-Dubel, S. (2014) Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT₆ receptors to promote neurite growth, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 590-597, doi: 10.1038/nchembio.1547.
179. Jessberger, S., Gage, F. H., Eisch, A. J., and Lagace, D. C. (2009) Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis, *Trends Neurosci.*, **32**, 575-582, doi: 10.1016/j.tins.2009.07.002.
180. Lu, T. T., Wan, C., Yang, W., and Cai, Z. (2019) Role of Cdk5 in amyloid-beta pathology of Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.*, **16**, 1206-1215, doi: 10.2174/1567205016666191210094435.
181. Liu, S. L., Wang, C., Jiang, T., Tan, L., Xing, A., and Yu, J. T. (2016) The role of Cdk5 in Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 4328-4342, doi: 10.1007/s12035-015-9369-x.
182. Lau, L. F., Seymour, P. A., Sanner, M. A., and Schachter, J. B. (2002) Cdk5 as a drug target for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.*, **19**, 267-273, doi: 10.1385/JMN:19:3:267.
183. Yun, H. M., Kim, S., Kim, H. J., Kostenis, E., Kim, J. I., Seong, J. Y., Baik, J. H., and Rhim, H. (2007) The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn, *J. Biol. Chem.*, **282**, 5496-5505, doi: 10.1074/jbc.M606215200.
184. Waterhouse, L. (1997) Genes tPA, Fyn, and FAK in autism? *J. Autism Dev. Disord.*, **27**, 220-223.
185. Chin, J., Palop, J. J., Puolivali, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Scarce-Levie, K., Masliah, E., and Mucke, L. (2005) Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **25**, 9694-9703, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2980-05.2005.
186. Li, C., and Gotz, J. (2017) Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation, *EMBO J.*, **36**, 3120-3138, doi: 10.15252/embj.201797724.
187. Yang, K., Belrose, J., Trepanier, C. H., Lei, G., Jackson, M. F., and MacDonald, J. F. (2011) Fyn, a potential target for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **27**, 243-252, doi: 10.3233/JAD-2011-110353.
188. Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litsersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., Do, L. H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., and Ksiezak-Reding, H. (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **24**, 2304-2312, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4162-03.2004.
189. Liang, X., Yao, Y., Lin, Y., Kong, L., Xiao, H., Shi, Y., and Yang, J. (2019) Panaxadiol inhibits synaptic dysfunction in Alzheimer's disease and targets the Fyn protein in APP/PS1 mice and APP-SH-SY5Y cells, *Life Sci.*, **221**, 35-46, doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.012.
190. Nygaard, H. B. (2018) Targeting Fyn kinase in Alzheimer's disease, *Biol. Psychiatry*, **83**, 369-376, doi: 10.1016/j.biopsych.2017.06.004.
191. Roberson, E. D., Halabisky, B., Yoo, J. W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G. Q., Palop, J. J., Noebels, J. L., and Mucke, L. (2011) Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **31**, 700-711, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011.
192. Stroth, N., and Svenningsson, P. (2015) S100B interacts with the serotonin 5-HT₇ receptor to regulate a depressive-like behavior, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **25**, 2372-2380, doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.10.003.
193. Shapiro, L. A., Bialowas-McGoey, L. A., and Whitaker-Azmitia, P. M. (2010) Effects of S100B on serotonergic plasticity and neuroinflammation in the hippocampus in down syndrome and Alzheimer's disease: studies in an S100B overexpressing mouse model, *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.*, **2010**, 153657, doi: 10.1155/2010/153657.
194. Cirillo, C., Capoccia, E., Iuvone, T., Cuomo, R., Sarnelli, G., Steardo, L., and Esposito, G. (2015) S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease, *BioMed Res. Int.*, **2015**, 508342, doi: 10.1155/2015/508342.
195. Leclerc, E., Sturchler, E., and Vetter, S. W. (2010) The S100B/RAGE axis in Alzheimer's disease, *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.*, **2010**, 539581, doi: 10.1155/2010/539581.
196. Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., and Town, T. (2010) Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *Glia*, **58**, 300-314, doi: 10.1002/glia.20924.
197. Mrak, R. E., and Griffinbc, W. S. (2001) The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **22**, 915-922, doi: 10.1016/s0197-4580(01)00293-7.
198. Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2019) Neuronal and behavioral plasticity: the role of serotonin and BDNF systems tandem, *Expert Opin. Ther. Targets*, **23**, 227-239, doi: 10.1080/14728222.2019.1572747.

SEROTONIN RECEPTORS – A POTENTIAL TARGET FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER’S DISEASE

Review

**D. V. Eremin^{1*}, E. M. Kondaurova¹, A. Ya. Rodny¹, K. A. Molobekova¹,
D. A. Kudlay², and V. S. Naumenko¹**

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: dima.969696@mail.ru*

² *I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia*

Alzheimer’s disease (AD) is the most common cause of dementia worldwide, having an increasing impact on aging societies. It is known that the serotonin (5-HT) system of the brain, in addition to its critical role in the control of various physiological functions and behaviors, is involved in the regulation of migration, proliferation, differentiation, maturation and programmed death of neurons. At the same time, increasing evidence indicates the involvement of 5-HT neurotransmission in the mechanisms underlying the formation of insoluble aggregates of β -amyloid and tau protein, which are the main histopathological signs of AD. In this review, we focused our attention on the available data on the participation of various 5-HT receptors and the intracellular signaling cascades induced by them in pathological processes leading to the development of AD. First of all, this concerns information about the involvement of 5-HT receptors in the mechanisms of protein aggregation in AD, which indicate that specific changes in the function of certain 5-HT receptors or associated intracellular signal transduction mediators prevent the accumulation of β -amyloid plaques and neurofibrillary tau protein tangles. Based on the accumulated experimental data, it can be assumed that the use of 5-HT receptors as new drug targets may not only be useful for improving cognitive performance in AD, but will also play an important role in treating the causes of AD-related dementia.

Keywords: Alzheimer’s disease, brain serotonin system, 5-HT receptors, β -amyloid, tau protein, protein aggregation

РОЛЬ УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНОЙ СИСТЕМЫ В БИОЛОГИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Обзор

© 2023 А.В. Буров, А.А. Родин, В.Л. Карпов, А.В. Морозов*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: runkel@inbox.ru*

Поступила в редакцию 11.09.2023

После доработки 17.11.2023

Принята к публикации 18.11.2023

Селективная деградация клеточных белков с участием убиквитин-протеасомной системы является одним из ключевых регуляторных механизмов в эукариотических клетках. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что убиквитин-протеасомная система участвует в регуляции фундаментальных процессов в стволовых клетках млекопитающих, включая пролиферацию, дифференцировку, миграцию, старение и программируемую гибель клеток. Регуляция может осуществляться либо путем протеолитической деградации ключевых транскрипционных факторов и белков сигнальных путей, либо путем посттрансляционных модификаций белков-мишеней убиквитином или другими убиквитинподобными модификаторами. Исследования молекулярных механизмов поддержания протеостаза в стволовых клетках имеют большое значение для разработки новых терапевтических подходов, направленных на лечение аутоиммунных, онкологических, нейродегенеративных и других социально-значимых патологий. Данный обзор охватывает актуальные данные о функции убиквитин-протеасомной системы в стволовых клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стволовые клетки, убиквитин-протеасомная система, протеасома.

DOI: 10.31857/S0320972523120060, **EDN:** NKAUYX

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки (СК) представляют собой неспециализированные клетки организма, которые могут дифференцироваться в различные типы клеток в зависимости от условий среды (рис. 1). Это свойство СК позволяет как формироваться живым организмам в процессе эмбриогенеза, так и в процессе жизнедеятельности обеспечивать самообновление и регенерацию тканей и органов [1]. Стволовыми клетками обладают многие виды многоклеточных организмов. Существует множество видов СК, которые принято разделять по потенциалу дифференцировки и способности к самообновлению, то есть количеству типов клеток, в которые они могут дифференцироваться, и способности сохранять свое неспе-

циализированное состояние (рис. 1) [2]. Таким образом, на примере человека СК в организме можно разделить на: тотипотентные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), мультипотентные стволовые клетки и унипотентные клетки, где тотипотентные и плюрипотентные стволовые клетки способны превращаться в клетки любого типа зрелого организма, а унипотентные клетки – лишь в определенный тип клеток (рис. 1). При патологии в организме могут возникать опухолевые стволовые клетки (ОСК), которые в контексте опухоли обладают свойствами нормальных СК, что позволяет поддерживать жизнедеятельность, стимулировать развитие новых, а также влиять на лекарственную устойчивость новообразований. Также существует возможность искусственного создания СК из зрелых

Принятые сокращения: ГКГС – главный комплекс гистосовместимости; ГСКС – гемопоэтические стволовые клетки; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ОСК – опухолевые стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; УПС – убиквитин-протеасомная система; СК – стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

* Адресат для корреспонденции.

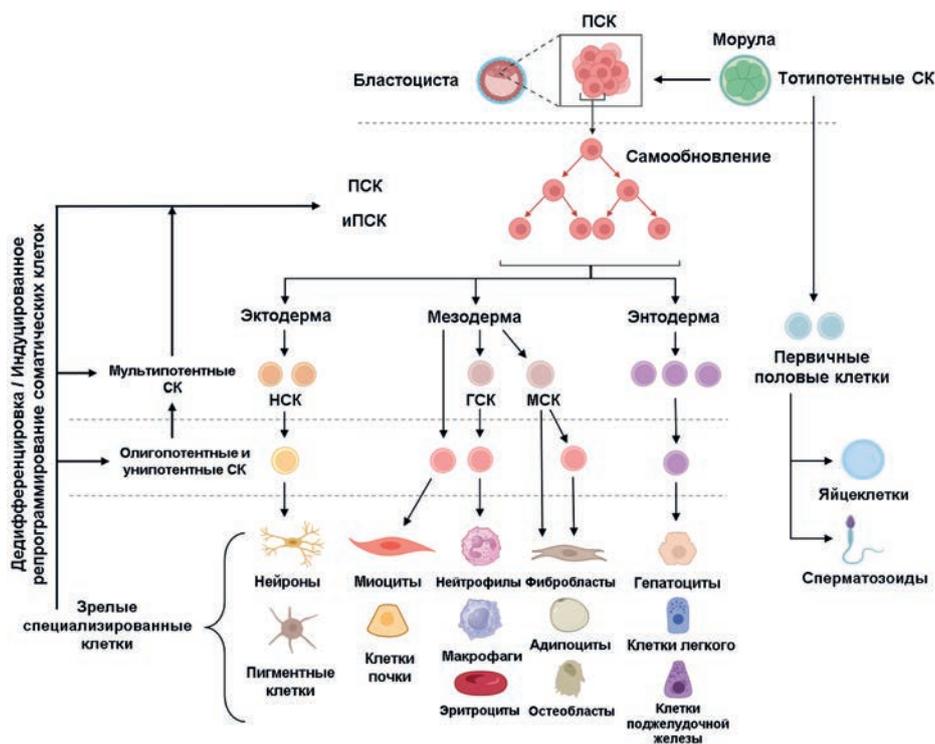


Рис. 1. Иерархия, виды и направления дифференцировки стволовых клеток, СК – стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; НСК – нейральные стволовые клетки; ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

клеток организма путем воздействия различных генетических и химических факторов на клетки; примером таких клеток являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК). Как и ПСК, иПСК способны давать начало большинству типов органов и тканей организма.

Характерной чертой СК являются активный метаболизм, высокий уровень транскрипции и синтеза белка, что требует наличия высокоорганизованной протеолитической системы. Данную функцию выполняют система аутофагии и убиквитин-протеасомная система (УПС). Если система аутофагии преимущественно отвечает за утилизацию белковых агрегатов и органелл, то УПС имеет более широкий функционал. Как и в других клетках организма, в СК УПС активно участвует в регуляции экспрессии генов, метаболических и энергетических процессах, осуществляя посттрансляционные модификации транскрипционных факторов, регулирует темп пролиферации и переход клеток к апоптозу, участвует в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов и др. [3].

В целом, УПС оказывает большое влияние на функциональный статус СК, в зависимости от условий либо поддерживая недифференцированное состояние, либо способствуя на-

правлению клетки на путь дифференцировки. Данная регуляторная система имеет сложную организацию, поэтому определение четкой роли УПС в биологии СК позволит вывести на новый уровень биоинженерные подходы к изучению стволовых клеток и их применение в медицине.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

СК обладают двумя универсальными свойствами: способность к самообновлению и способность к преобразованию в специализированные клетки, формирующие зрелые ткани и органы, то есть способность к дифференцировке (рис. 1). Эти свойства проявляются СК при делении двух типов: симметричном, когда СК лишь воспроизводят свои недифференцированные клоны, и асимметричном, когда в процессе деления получается одна более специализированная клетка и одна недифференцированная. Функциональное состояние и дифференцировочный потенциал СК отличается на разных стадиях развития организма. На начальных стадиях развития (стадия зиготы и морулы) организм состоит из тотипотентных клеток, каждая из которых имеет

неограниченный потенциал к делению и способна в случае изоляции дать начало новому организму. На эмбриональном этапе (стадия бластоцисты и последующие стадии формирования зародыша) дифференцировочный потенциал СК снижается. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) становятся плюрипотентными, что означает лишь их способность к универсальной дифференцировке в любой из типов клеток зрелого организма [4]. В ходе дальнейшего онтогенеза дифференцировочный потенциал большинства ПСК ограничивается еще сильнее, они трансформируются в зрелые тканеспецифичные стволовые клетки (постнатальные СК). К таким зрелым стволовым клеткам можно отнести мультипотентные и унипотентные стволовые клетки. Примером мультипотентных клеток могут служить мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). ГСК способны давать начало всем видам миелоидных и лимфоидных клеток (рис. 1). МСК имеют возможность хондрогенной, остеогенной и адипогенной дифференцировки. Унипотентные стволовые клетки представляют собой тканеспецифичные клетки-предшественники, их отличием является очень узкая возможность дифференцировки всего в один тип клеток и ограниченная возможность самообновления, то есть они делятся определенное количество раз [5]. Благодаря своим уникальным свойствам в поддержании функционального статуса ткани, иммуномодулирующим функциям, способности к хоумингу и др. СК являются объектом пристального изучения с целью применения в области регенеративной медицины, тканевой инженерии и терапии многих онкологических и нейродегенеративных заболеваний [1, 6]. Особое внимание привлекает возможность получения iPСК из соматических клеток путем искусственного репрограммирования (рис. 1). Такой подход позволяет получить СК, обладающие дифференцировочным потенциалом и свойствами, аналогичными ПСК, и использовать их как для изучения *in vitro* в качестве универсального модельного объекта, так и для применения в медицинской практике, например, трансплантологии [2, 7]. Подобная пластичность СК была бы невозможна без сложной внутриклеточной системы контроля пролиферации. Баланс между процессами дифференцировки, старения и клеточной гибели поддерживается в первую очередь за счет скоординированной работы большого количества транскрипционных факторов. При этом уровень экспрессии генов многих факторов транскрипции кос-

венно регулируется внутриклеточными протеолитическими системами, в том числе убиквитин-протеасомной системой. Данная система работает и в цитоплазме, и в клеточном ядре, осуществляя селективный протеолиз белковых молекул. Неоднократно было показано участие УПС в поддержании потенциальности СК [8, 9], однако функции УПС в СК на этом не ограничиваются. УПС также активно участвует в процессе дифференцировки, задавая вектор развития СК [10, 11]. Интенсивность протеолиза в СК с участием УПС и скорость дифференцировки зависит от концентрации макроэргических субстратов в клетке, а также от баланса между анаэробными и аэробными катаболическими процессами [12]. Хотя считается, что в основном клетки используют гликолиз, было показано, что *in vitro* для ЭСК характерен высокий уровень окислительного фосфорилирования и продукции АТФ с участием митохондрий [13]. Для МСК и ГСК в недифференцированном состоянии покоя характерна высокая гликолитическая активность, которая почти полностью обеспечивает клетки АТФ [14]. АТФ в комплексе с двухвалентными ионами, в первую очередь ионами магния Mg^{2+} , оказывает влияние на работу УПС [15]. Поэтому в случае повреждения элементов электронно-транспортной цепи митохондрий происходит снижение концентрации АТФ в цитозоле, что приводит к снижению АТФ-зависимого протеолиза с участием УПС. Следствием этих молекулярных событий может стать преждевременная дифференцировка или даже старение и переход СК к апоптозу. Для более детального понимания работы УПС в СК необходимо рассмотреть ее основные функциональные элементы, непосредственно осуществляющие протеолиз, а также механизмы, регулирующие этот процесс.

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА

Поддержание динамического равновесия в протеоме является необходимым условием для нормального метаболизма и долгосрочного обеспечения жизнедеятельности любого типа клеток и органов [16]. В клетках эукариот эту функцию выполняет УПС.

УПС – высокоорганизованная система, включающая в себя множество макромолекулярных компонентов. Результат согласованных взаимодействий этих молекул проявляется в избирательном мечении и последующей деградации белков [17]. Селективность протеолиза

обеспечивается убиквитинированием – посттрансляционной модификацией белков, представляющей собой ковалентное присоединение молекулы убиквитина.

Убиквитин – это белок массой 8,5 кДа, который играет важнейшую роль в регуляции таких процессов, как прохождение клеточного цикла, клеточная дифференцировка, апоптоз, репарация ДНК и др. [18] В процессе убиквитинирования задействованы 3 группы специфических ферментов: E1 – убиквитин-активирующий фермент, E2 – убиквитин-сопрягающие ферменты и E3 – убиквитин-лигазы, осуществляющие перенос молекул убиквитина на конкретные субстраты [19]. В ходе убиквитинирования белок обретает молекулярную метку, чаще всего представляющую собой полиубиквитиновую цепь, мономеры которой соединены между собой изопептидными связями. Следует отметить, что наличие специфической полиубиквитиновой цепи на молекуле белка далеко не всегда приводит к его протеолизу [20, 21]. Тем не менее присоединение большинства типов убиквитиновых цепей, в том числе и моноубиквитинирование, так или иначе опосредует деградацию белка [22]. Помимо убиквитиновой метки, в составе белка для его эффективной деградации должен присутствовать неструктурированный участок – дегрон [23].

Дальнейшие химические преобразования субстрата обеспечиваются работой протеасом – макромолекулярных белковых комплексов, обладающих протеолитической активностью. Протеасомы осуществляют протеолиз белковых субстратов с образованием коротких пептидов, которые в дальнейшем с участием пептидаз могут разрушаться до отдельных аминокислот [24] либо могут выполнять функции биологически активных сигнальных молекул как внутри, так и вне клетки [25, 26]. Протеасомы являются основной функциональной единицей УПС, так как непосредственно осуществляют протеолиз, однако для них характерно высокое структурное разнообразие. Это разнообразие обеспечивается встраиванием в протеасому альтернативных каталитических субъединиц, взаимодействием с различными регуляторными белковыми комплексами, а также посттрансляционными модификациями ее компонентов [27].

Основным структурным элементом в составе протеасомного комплекса является 20S-протеасома. Это высококонсервативный белковый комплекс, наличие которого в клетках характерно как для эукариотических, так и для некоторых прокариотических организ-

мов [28]. 20S-Протеасома эукариот представляет собой симметричную бочка-подобную структуру ($M = 700$ кДа), состоящую из четырех уложенных друг на друга гептамерных колец [29]. Каждое из двух внешних колец включает в себя α -субъединицы ($\alpha 1$ – $\alpha 7$), выполняющие структурную функцию, а также предотвращающие случайный доступ субстрата во внутреннюю протеолитическую камеру, образованную двумя кольцами β -субъединиц ($\beta 1$ – $\beta 7$) [27, 29, 30]. По три из семи β -субъединиц в каждом из внутренних колец протеасом эукариот обладают специфической каталитической активностью за счет наличия активного остатка треонина на N -конце полипептидной цепи [31]. В составе конститутивной 20S-протеасомы $\beta 1$ -субъединица осуществляет гидролиз пептидной связи после кислых остатков (каспазаподобная активность), $\beta 2$ -субъединица – после основных (трипсинподобная активность), а $\beta 5$ -субъединица – после гидрофобных остатков (химотрипсинподобная активность) [17, 32].

Убиквитин-зависимый протеолиз подразумевает ассоциацию 20S-протеасомы с одним или двумя 19S-регуляторами, такой комплекс называют 26S-протеасомой [33]. Субъединицы регулятора осуществляют распознавание, деубиквитинирование, разворачивание молекулы субстрата и ее протаскивание в каталитическую камеру 20S-протеасомы [34, 35]. Помимо 19S-регулятора, обратимо присоединяться к внешним кольцам α -субъединиц 20S-протеасомы может и ряд других регуляторов, таких как PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ , PA200 и PI31. Причем не исключено одновременное присоединение двух различных регуляторов к одной 20S-протеасоме, и в этом случае образуется так называемая гибридная протеасома [36, 37]. В целом, функция протеасомных регуляторов заключается в обеспечении субстратной специфичности и облегчении доступа субстратов в протеолитическую камеру протеасомы [38].

У большинства челюстноротых (за исключением птиц), помимо наличия или отсутствия ассоциированного регулятора, структура и активность 20S-протеасом может изменяться за счет встраивания неканонических каталитических субъединиц, которые являются гомологами конститутивных субъединиц [39]. В определенных типах клеток (например, иммунных клетках) постоянно экспрессируются так называемые иммунные субъединицы $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) и $\beta 5i$ (LMP7) [40]. При сборке протеасомы они могут встраиваться в оба β -кольца вместо своих конститутивных гомологов, образуя тем самым иммунопротеасомы [40].

При этом в клетках, которые в норме не экспрессируют иммунные субъединицы, возможна индукция их экспрессии под действием таких провоспалительных цитокинов, как интерферон гамма (ИФН- γ) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) [41–43]. Субъединица $\beta 2i$ проявляет трипсинподобную активность, а субъединицы $\beta 1i$ и $\beta 5i$ – химотрипсинподобную [44]. Соответственно, в отличие от конститутивной 20S-протеасомы, иммунопротеасома обладает существенно сниженной каспазаподобной активностью, при этом проявляет повышенную химотрипсинподобную активность. Поэтому, по сравнению с конститутивными протеасомами, иммунопротеасомы более эффективно продуцируют пептиды, С-конец которых представлен аминокислотой с гидрофобным радикалом. Это позволяет данным пептидам впоследствии связываться с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) первого класса, что является ключевым этапом на пути презентации антигена на поверхности клетки и обуславливает важную роль иммунопротеасом при воспалительных процессах и инфекциях [45].

Помимо иммунопротеасом, также существует ряд других неканонических форм протеасом, образующихся за счет комбинаторного встраивания альтернативных субъединиц. Важной характеристикой тотального пула протеасом в клетке является процентное содержание и относительная активность той или иной формы 20S-протеасом. При этом данный показатель является динамичным, и пул протеасом меняется в ходе онтогенеза, в том числе и при дифференцировке СК [46]. По всей вероятности, варианты форм протеасом выполняют специфические функции, при этом некоторые из них привязаны к определенному типу ткани в организме [47]. Так, например, тимопротеасомы можно найти в эпителиальных клетках кортикального слоя тимуса [48]. Такие протеасомы, помимо $\beta 1i$ и $\beta 2i$, включают в свой состав также уникальную каталитическую субъединицу $\beta 5t$ и играют важную роль в положительной селекции Т-лимфоцитов [41, 48–50]. Было показано, что *de novo* экспрессия тимопротеасом в МСК значительно увеличивает их терапевтический потенциал в качестве противоопухолевой вакцины, активирующей CD8⁺ Т-лимфоциты [51].

Очевидно, что такая вариативность в структуре, возможность присоединения регуляторов обеспечивают высокую функциональную мобильность УПС. Это подтверждается тем, что протеасомы осуществляют протеолитическую регуляцию огромного числа сиг-

нальных биохимических путей. В то же время высокий уровень организации УПС сопряжен с риском развития различных патологий в случае нарушения работы протеолитической системы. Мутации в генах УПС могут приводить к развитию онкологических, нейродегенеративных, аутоиммунных и метаболических заболеваний [52]. Учитывая вышесказанное, неудивительно, что УПС в СК принимает участие в регуляции дифференцировки. На сегодняшний день активно исследуется то, как именно и за счет протеолиза каких белковых молекул протеасомы влияют на интенсивность пролиферации и реализацию дифференцировочного потенциала СК.

ФУНКЦИИ УПС В СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Поддержание недифференцированного состояния СК. Регуляция процесса дифференцировки СК и возможность получения ИПСК путем репрограммирования соматических клеток давно привлекают внимание научного сообщества. Несмотря на активное изучение этого вопроса и попытки выявить генетические и эпигенетические закономерности развития СК [53], универсальные механизмы, определяющие пролиферативный статус СК, остаются не до конца понятными. Во многом дифференцировка СК зависит от взаимодействий белков внутри клетки, в том числе от убиквитинирования и селективного протеолиза ряда транскрипционных факторов. Так, убиквитинирование и протеасомная деградация ключевых транскрипционных факторов NANOG, OCT-3/4, SOX2, KLF4, C-MYC, LIN28 в СК определяют судьбу клеток, поддержание недифференцированного состояния и запуск процесса дифференцировки [9, 11, 54, 55] (таблица). Селективный протеолиз транскрипционных факторов – не единственный механизм, реализуемый УПС в регуляции поддержания потенциальности СК. УПС также исполняет роль главной системы контроля качества при накоплении в клетке поврежденных и неправильно свернутых белков. Показано, что в ЭСК активность убиквитин-зависимого протеолиза повышена и зависит от уровня экспрессии гена *PSMD11*, который кодирует одну из субъединиц 19S-регулятора протеасом, что может иметь значение для защиты клеток от протеотоксического стресса (таблица) [56]. При этом при дифференцировке уровень экспрессии *PSMD11* и активность протеасом существенно снижались [56].

Для зрелых мышечных СК в условиях искусственного нокаута другой субъединицы 19S-регулятора (Rpt3) была показана утрата способности участвовать в регенерации поврежденной мышечной ткани (таблица) [57]. Более того, для ПСК, по сравнению с их более дифференцированными потомками, характерен более высокий уровень экспрессии генов таких E3-убиквитинлигаз, как HERC2, UBE3A, UBR7 и RNF181 (таблица) [58], что, по-видимому, играет роль в поддержании баланса содержания эндогенных регуляторных белков. Для поддержания гомеостаза клеткой непрерывный процесс убиквитинирования белков должен быть сбалансирован обратным процессом – деубиквитинированием. Действительно, активность деубиквитинирующих ферментов также влияет на поддержание потенциальности СК и процесс их дифференцировки. Так, например, было показано, что в ЭСК деубиквитинирование и, как следствие, стабилизация транскрипционного фактора NANOG, приводит к поддержанию недифференцированного состояния клеток [59]. В нейральных стволовых клетках (НСК) активность деубиквитиназы USP7 предотвращает деградацию транскрипционного фактора REST, участвующего в поддержании потенциальности. Нокаут гена, кодирующего USP7, приводит к быстрой убиквитин-зависимой протеолитической деградации REST и немедленной дифференцировке НСК [60]. Также была показана роль деубиквитиназы USP44 в поддержании плюрипотентного состояния ЭСК [61]. USP44 предотвращает накопление убиквитинированных гистонов H2B в ядрах ЭСК, что позволяет клеткам оставаться в плюрипотентном состоянии. Переход к дифференцировке сопряжен с падением экспрессии USP44 и повышением количества убиквитинированного гистона H2B [61]. Данный пример указывает на то, что деубиквитинирующие ферменты могут регулировать процесс дифференцировки не только за счет прямого взаимодействия с транскрипционными факторами, а также за счет модификации гистонов в областях, ассоциированных с промоторами транскрипционных факторов. Еще одним подтверждением данной гипотезы служит участие деубиквитиназы USP21 в экспрессии генов, регулируемых NANOG [59], а также USP22 – в экспрессии гена, кодирующего ключевой фактор плюрипотентности (SOX2). USP22 специфично связывается и осуществляет деубиквитинирование гистонов в промоторных областях гена *SOX2*, тем самым снижая уровень транскрипции гена, стимулируя процесс диффе-

ренцировки [62]. Таким образом, во многих ПСК смещение баланса между процессами убиквитинирования и деубиквитинирования отражается на статусе этих клеток, зачастую приводя к их дифференцировке.

Все это указывает на важную роль убиквитин-зависимого протеолиза, однако в случае общего нарушения протеостаза активно функционируют и свободные 20S-протеасомы, осуществляя убиквитин-независимый протеолиз [63]. Также было показано, что воздействие на МСК специфического ингибитора протеасом Mg132 приводит к ускоренному старению клеток, что, в свою очередь, обычно является причиной снижения дифференцировочного потенциала СК, что, например, может проявляться в утрате остеогенного и хондрогенного потенциала и усилении адипогенной дифференцировки у старых МСК [64, 65]. Это подтверждается данными, указывающими на то, что в МСК снижение пролиферативного потенциала сопряжено с падением активности и уровня экспрессии конститутивных протеасом [66]. Таким образом, нарушения в работе УПС приводят к быстрому клеточному старению и, в случае СК, к снижению дифференцировочного потенциала.

В целом, стабильная работа УПС необходима для поддержания потенциальности всех типов СК, от ЭСК до зрелых прогениторных клеток, а УПС-зависимое поддержание протеостаза – одно из главных условий нормального функционирования стволовых клеток [8].

Роль УПС в дифференцировке СК. УПС принимает активное участие в дифферен-

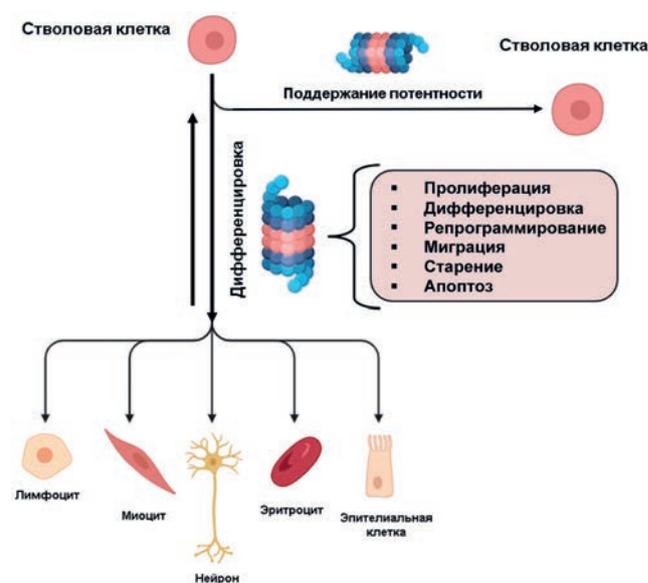


Рис. 2. Роль протеасом в дифференцировке и поддержании потенциальности СК

Функции различных компонентов УПС в стволовых клетках

Тип клеток	Компонент УПС	Функция	Ссылка
Плюрипотентные			
ЭСК/иПСК	субъединицы 19S-регулятора протеасом Rpn11/Rpn6 и E3-убиквитинлигазы FBXW7, FBXW8	поддержание плюрипотентного состояния/индукция дифференцировки	[9, 54–56]
	субъединица 19S-регулятора протеасом Rpn6 (<i>PSMD11</i>)	поддержание протеостаза и контроль пролиферации	[56]
	HECT – E3-убиквитинлигазы (HERC2, UBE3A) и RING – E3-убиквитинлигазы (UBR7, RNF181)	поддержание стабильного общего уровня синтеза белка, созревания рРНК, контроль работы теломеразы и регуляция гликолитического метаболизма в клетке	[58]
	деубиквитинирующий фермент USP44	деубиквитинирование гистона H2B, модуляция экспрессии <i>OCT4</i> и <i>NANOG</i>	[61]
	деубиквитинирующий фермент USP21	стабилизация <i>NANOG</i> , деубиквитинирование гистона H2A	[59]
	деубиквитинирующий фермент USP22	деубиквитинирование гистона H2B, ассоциированного с промотором гена <i>SOX2</i>	[60]
	E3-убиквитинлигаза RNF20	убиквитинирование гистона H2B, негативная регуляция экспрессии генов, кодирующих C-FOS и C-MYC	[61, 71]
регулятор протеасом PA28 α , иммунные протеасомы	деградация окисленных и поврежденных белков	[72, 77]	
Мультипотентные и унипотентные			
МСК	субъединицы 20S-протеасом β 5/ β 2	стимуляция самообновления, контроль активности транскрипционных факторов, определяющих плюрипотентное состояние СК	[66]
	E3-убиквитинлигаза RNF40	убиквитинирование гистона H2B, позитивная регуляция экспрессии генов дифференцировки	[70]
ГСК	иммунная субъединица протеасом β 5i	контроль эффективности презентации антигенов в составе ГКГС первого класса	[76]
	E3-убиквитинлигаза c-Cbl	убиквитинирование транскрипционных факторов NOTCH, C-KIT и STAT5	[68]
НСК	убиквитин-модифицирующий фермент UBA1	дифференцировка мотонейронов	[10]
	деубиквитинирующий фермент USP7	предотвращение протеолитической деградации транскрипционного фактора REST и перехода к дифференцировке	[60]
мышечные СК	субъединица 19S-регулятора протеасом Rpt3	поддержание высокой активности убиквитин-зависимого протеолиза, обеспечение выживания СК и эффективной дифференцировки	[57]
эпидермальные СК	E3-убиквитинлигаза Smurf2	убиквитинирование β -катенина и модуляция дифференцировки	[69]

цировке СК (рис. 2). Гомеостаз на тканевом уровне требует постоянного обновления состарившихся и поврежденных клеток. Эту функцию на себя берут соответствующие зрелые резидентные СК. Чтобы находиться в балансе между пролиферацией, дифференцировкой, старением и апоптозом, эти СК должны иметь систему, способную интегрировать все сигналы внутренней и внешней среды и трансформировать их в соответствующие регуляторные молекулярные преобразования. УПС принимает непосредственное участие в этом процессе и здесь также большую роль играет убиквитинирование транскрипционных факторов [67]. Так, например, в ГСК повышение уровня экспрессии гена, кодирующего E3-лигазу c-Cbl, сопряжено с переходом к дифференцировке. Данная E3-лигаза убиквитинирует и направляет на протеасомную деградацию транскрипционные факторы NOTCH, C-KIT и STAT5, которые предотвращают выход из недифференцированного состояния (таблица) [68]. В эпидермальных СК E3-лигаза SMURF2 модулирует дифференцировку клеток путем убиквитинирования β -катенина [69]. Помимо убиквитинирования транскрипционных факторов, важную роль в запуске дифференцировки также играют соответствующие модификации гистонов. Так, например, в МСК по ходу дифференцировки возрастает уровень экспрессии E3-лигазы RNF40, которая катализирует присоединение убиквитина к гистону H2B [70]. Внесение этой модификации приводит к формированию открытого хроматина и повышению уровня экспрессии генов дифференцировки. То же самое происходит с участием E3-лигазы RNF20, но она при дифференцировке негативно регулирует экспрессию протоонкогенов C-FOS и C-MYC (таблица) [61, 71].

Помимо динамических изменений в работе E3-лигаз, по ходу дифференцировки может изменяться уровень убиквитинирования компонентов УПС. Было показано, что в ходе дифференцировки ИПСК в мотонейроны в клетках значительно возрастает количество убиквитинированного белка UBA1 (E1), а обработка клеток специфическим ингибитором UBA1 приводит к снижению эффективности дифференцировки и выживаемости мотонейронов (таблица) [10]. Стоит также отметить, что в мышечных ЭСК при дифференцировке было выявлено повышение экспрессии иммунных протеасом, а также протеасом, несущих регулятор PA28 $\alpha\beta$, что было связано с уменьшением количества окисленных и поврежденных белков [72].

УПС, ОПУХОЛЕВЫЕ СК И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Биология СК тесно связана с биологией злокачественных опухолей, поскольку формирование опухоли всегда начинается с локальной группы клеток, которые претерпевают злокачественную трансформацию и впоследствии дают начало всем остальным клеткам опухоли. Такие клетки называют опухолевыми стволовыми клетками. Метаболизм ОСК представляет особый интерес, поскольку именно эти клетки могут выжить в ходе цитостатической терапии и стать причиной рецидива, дав начало вторичной опухоли [73]. Как и в нормальных СК, в ОСК убиквитин-протеасомная система играет важную роль, однако было показано, что в ОСК, по сравнению с другими клетками опухоли, активность протеасом снижена и не так активно идет селективный убиквитин-зависимый протеолиз [74, 75]. По-видимому, это общая черта для ОСК в различных типах опухолей. Изучение механизмов регуляции пролиферации ОСК с участием УПС может пролить свет на закономерности формирования опухолей и помочь в разработке соответствующих терапевтических подходов.

Перспективным применением СК является регенеративная медицина и клеточная терапия, подразумевающая трансплантацию СК. Данный подход используют для замещения поврежденных тканей и регенерации отдельных органов пациентов. Этот метод применялся неоднократно и показал многообещающие результаты на этапе клинических испытаний в случае таких заболеваний, как сахарный диабет, хронический миелоидный лейкоз, цирроз печени и легочный фиброз [1]. Однако есть ряд ограничений, не позволяющих повсеместно применять методы регенеративной медицины. Во-первых, трансплантация СК в случае нарушения молекулярных механизмов контроля пролиферации в пересаженных клетках может привести к формированию опухоли в теле реципиента [1]. Во-вторых, пересадка чужеродных клеток может вызывать у реципиента иммунную реакцию, что также может быть связано с протеолитической активностью иммунопротеасом. В СК иммунопротеасомы участвуют в процессе презентации антигенов в составе ГКГС первого класса, а полиморфизм генов иммунных субъединиц (в частности, гена *PSMB8*, кодирующего $\beta 5i$ -субъединицу) может влиять на эффективность трансплантации ГСК и вызывать аутоиммунные реакции (таблица) [76]. При этом в ходе дифференцировки в некоторых СК экспрессия генов

иммунных субъединиц, а также активность самих иммунных протеасом повышаются, однако не до конца ясно, что здесь является причиной, а что – следствием [72, 77]. Так или иначе, стволовые клетки являются важным инструментом для изучения органогенеза и регенеративных способностей организма. Они также являются хорошей моделью для изучения патогенетических механизмов развития множества заболеваний и дают возможность разработки биологических моделей для изучения новых фармакологических препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разные типы СК обладают различным потенциалом к пролиферации и дифференцировке. УПС является неотъемлемым элементом метаболизма любой клетки, в том числе и СК, однако особый интерес представляет ее функциональная нагрузка в недифференцированных СК. УПС в СК участвует в сохранении недифференцированного состояния, а также поддерживает хрупкий баланс между пролиферацией, дифференцировкой, старением и апоптозом. В СК УПС осуществляет деградацию большинства белков (в том числе окисленных и поврежденных), регулирует клеточный цикл и активность транскрипционных факторов с помощью E3-убиквитинлигаз, а также деубиквитирующих ферментов. В связи с двойкой функцией УПС ингибирование активности протеасом в СК может привести к разным последствиям в зависимости

от условий. С одной стороны, эффект может проявиться в негативной регуляции факторов стволовости и активации факторов, направляющих СК на путь дифференцировки, с другой стороны, метаболизм клетки может сильно пострадать и вместо дифференцировки приведет к преждевременному старению и апоптозу СК. В этой связи необходимо иметь ясное представление о том, за счет каких молекулярных механизмов в СК поддерживается данный баланс. Это также позволит более детально изучить биологию СК, включая ОСК, и найти новые подходы к терапии социально-значимых заболеваний. Понимание роли УПС в целом и ее компонентов по отдельности в репрограммировании и трансдифференцировке СК позволит добиться значительного прогресса в прикладных областях медицины, включая регенеративную медицину, заместительную клеточную терапию и скрининг лекарственных препаратов.

Вклад авторов. А.В. Буров, А.А. Родин – написание текста; А.В. Морозов, В.Л. Карпов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075-15-2020-773.

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

- Kolios, G., and Moodley, Y. (2013) Introduction to stem cells and regenerative medicine, *Respiration*, **85**, 3-10, doi: 10.1159/000345615.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., and Rybak, Z. (2019) Stem cells: past, present, and future, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 68, doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- Selenina, A. V., Tsimokha, A. S., and Tomilin, A. N. (2017) Proteasomes in protein homeostasis of pluripotent stem cells, *Acta Naturae*, **9**, 39-47, doi: 10.32607/20758251-2017-9-3-39-47.
- Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2011) Biology of stem cells: an overview, *Kidney Int. Suppl.*, **1**, 63-67, doi: 10.1038/kisup.2011.15.
- Preston, S. L., Alison, M. R., Forbes, S. J., Direkze, N. C., Poulson, R., and Wright, N. A. (2003) The new stem cell biology: something for everyone, *Mol. Pathol.*, **56**, 86-96, doi: 10.1136/mp.56.2.86.
- Lim, S. K., and Khoo, B. Y. (2021) An overview of mesenchymal stem cells and their potential therapeutic benefits in cancer therapy, *Oncol. Lett.*, **22**, 785, doi: 10.3892/ol.2021.13046.
- Apostolou, E., Blau, H., Chien, K., Lancaster, M. A., Tata, P. R., Trompouki, E., Watt, F. M., Zeng, Y. A., and Zernicka-Goetz, M. (2023) Progress and challenges in stem cell biology, *Nat. Cell Biol.*, **25**, 203-206, doi: 10.1038/s41556-023-01087-y.
- Naujokat, C., and Sarić, T. (2007) Concise review: role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells, *Stem Cells*, **25**, 2408-2418, doi: 10.1634/stemcells.2007-0255.
- Okita, Y., and Nakayama, K. I. (2012) UPS delivers pluripotency, *Cell Stem Cell*, **11**, 728-730, doi: 10.1016/j.stem.2012.11.009.
- Bax, M., McKenna, J., Do-Ha, D., Stevens, C. H., Higginbottom, S., Balez, R., Cabral-da-Silva, M. E. C.,

- Farrarwell, N. E., Engel, M., Poronnik, P., Yerbury, J. J., Saunders, D. N., and Ooi, L. (2019) The ubiquitin proteasome system is a key regulator of pluripotent stem cell survival and motor neuron differentiation, *Cells*, **8**, 581, doi: 10.3390/cells8060581.
11. Choi, J., and Baek, K. H. (2018) Cellular functions of stem cell factors mediated by the ubiquitin-proteasome system, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 1947-1957, doi: 10.1007/s00018-018-2770-7.
 12. Hu, C., Fan, L., Cen, P., Chen, E., Jiang, Z., and Li, L. (2016) Energy metabolism plays a critical role in stem cell maintenance and differentiation, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 253, doi: 10.3390/ijms17020253.
 13. Birket, M. J., Orr, A. L., Gerencser, A. A., Madden, D. T., Vitelli, C., Swistowski, A., Brand, M. D., and Zeng, X. (2011) A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells, *J. Cell. Sci.*, **124**, 348-358, doi: 10.1242/jcs.072272.
 14. Fillmore, N., Huqi, A., Jaswal, J. S., Mori, J., Paulin, R., Haromy, A., Onay-Besikci, A., Ionescu, L., Thébaud, B., Michelakis, E., and Lopaschuk, G. D. (2015) Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival, *PLoS One*, **10**, e0120257, doi: 10.1371/journal.pone.0120257.
 15. Morozov, A., Astakhova, T., Erokhov, P., and Karpov, V. (2022) The ATP/Mg²⁺ balance affects the degradation of short fluorogenic substrates by the 20S proteasome, *Methods Protoc.*, **5**, 15, doi: 10.3390/mps5010015.
 16. Dikic, I. (2017) Proteasomal and autophagic degradation systems, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 193-224, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.
 17. Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Cohen-Rosenzweig, C., and Ciechanover, A. (2016) The ubiquitin-proteasome system and autophagy: coordinated and independent activities, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **79**, 403-418, doi: 10.1016/j.biocel.2016.07.019.
 18. Finley, D., and Varshavsky, A. (1985) The ubiquitin system: functions and mechanisms, *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 343-347, doi: 10.1016/0968-0004(85)90108-2.
 19. Ciechanover, A., and Kwon, Y. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies, *Exp. Mol. Med.*, **47**, e147, doi: 10.1038/emm.2014.117.
 20. Yau, R., and Rape, M. (2016) The increasing complexity of the ubiquitin code, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 579-586, doi: 10.1038/ncb3358.
 21. Swatek, K. N., and Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications, *Cell Res.*, **26**, 399-422, doi: 10.1038/cr.2016.39.
 22. Braten, O., Livneh, I., Ziv, T., Admon, A., Kehat, I., Caspi, L. H., Gonen, H., Bercovich, B., Godzik, A., Jahandideh, S., Jaroszewski, L., Sommer, T., Kwon, Y. T., Guharoy, M., Tompa, P., and Ciechanover, A. (2016) Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4639-E4647, doi: 10.1073/pnas.1608644113.
 23. Collins, G. A., and Goldberg, A. L. (2017) The logic of the 26S proteasome, *Cell*, **169**, 792-806, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.023.
 24. Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., Van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W., and Neefjes, J. (2003) Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I, *Immunity*, **18**, 97-108, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00511-3.
 25. De Araujo, C. B., Heimann, A. S., Remer, R. A., Russo, L. C., Colquhoun, A., Forti, F. L., and Ferro, E. S. (2019) Intracellular peptides in cell biology and pharmacology, *Biomolecules*, **9**, 150, doi: 10.3390/biom9040150.
 26. Ramachandran, K. V., and Margolis, S. S. (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 419-430, doi: 10.1038/nsmb.3389.
 27. Finley, D., Chen, X., and Walters, K. J. (2016) Gates, channels, and switches: elements of the proteasome machine, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 77-93, doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.009.
 28. Humbard, M. A., and Maupin-Furlow, J. A. (2013) Prokaryotic proteasomes: nanocompartments of degradation, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 321-334, doi: 10.1159/000351348.
 29. Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., and Hochstrasser, M. (2017) Proteasome structure and assembly, *J. Mol. Biol.*, **429**, 3500-3524, doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.027.
 30. Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature*, **386**, 463-471, doi: 10.1038/386463a0.
 31. Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.*, **82**, 373-428, doi: 10.1152/physrev.00027.2001.
 32. Rousseau, A., and Bertolotti, A. (2018) Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 697-712, doi: 10.1038/s41580-018-0040-z.
 33. Tanaka, K. (2009) The proteasome: overview of structure and functions, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **85**, 12-36, doi: 10.2183/pjab.85.12.
 34. Lu, Y., Lee, B. H., King, R. W., Finley, D., and Kirschner, M. W. (2015) Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis, *Science*, **348**, 1250834, doi: 10.1126/science.1250834.
 35. Liu, C. W., and Jacobson, A. D. (2013) Functions of the 19S complex in proteasomal degradation,

- Trends Biochem. Sci.*, **38**, 103-110, doi: 10.1016/j.tibs.2012.11.009.
36. Blickwedehl, J., Agarwal, M., Seong, C., Pandita, R. K., Melendy, T., Sung, P., Pandita, T. K., and Bangia, N. (2008) Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16165-16170, doi: 10.1073/pnas.0803145105.
 37. Bochmann, I., Ebstein, F., Lehmann, A., Wohlschlaeger, J., Sixt, S. U., Kloetzel, P. M., and Dahlmann, B. (2014) T lymphocytes export proteasomes by way of microparticles: a possible mechanism for generation of extracellular proteasomes, *J. Cell Mol. Med.*, **18**, 59-68, doi: 10.1111/jcmm.12160.
 38. Morozov, A. V., and Karpov, V. L. (2018) Biological consequences of structural and functional proteasome diversity, *Heliyon*, **4**, e00894, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00894.
 39. Ferrington, D. A., and Gregerson, D. S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **109**, 75-112, doi: 10.1016/B978-0-12-397863-9.00003-1.
 40. Kammerl, I. E., and Meiners, S. (2016) Proteasome function shapes innate and adaptive immune responses, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **311**, L328-L336, doi: 10.1152/ajplung.00156.2016.
 41. Murata, S., Takahama, Y., Kasahara, M., and Tanaka, K. (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease, *Nat. Immunol.*, **19**, 923-931, doi: 10.1038/s41590-018-0186-z.
 42. Kimura, H., Caturegli, P., Takahashi, M., and Suzuki, K. (2015) New Insights into the function of the immunoproteasome in immune and nonimmune cells, *J. Immunol. Res.*, **2015**, 541984, doi: 10.1155/2015/541984.
 43. Lundh, M., Bugliani, M., Dahlby, T., Chou, D. H., Wagner, B., Ghiasi, S. M., De Tata, V., Chen, Z., Lund, M. N., Davies, M. J., Marchetti, P., and Mandrup-Poulsen, T. (2017) The immunoproteasome is induced by cytokines and regulates apoptosis in human islets, *J. Endocrinol.*, **233**, 369-379, doi: 10.1530/JOE-17-0110.
 44. Johnston-Carey, H. K., Pomatto, L. C., and Davies, K. J. (2015) The immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **51**, 268-281, doi: 10.3109/10409238.2016.1172554.
 45. Ebstein, F., Textoris-Taube, K., Keller, C., Golnik, R., Vigneron, N., Van den Eynde, B. J., Schuler-Thurner, B., Schadendorf, D., Lorenz, F. K., Uckert, W., Urban, S., Lehmann, A., Albrecht-Koepke, N., Janek, K., Henklein, P., Niewianda, A., Kloetzel, P. M., and Mishto, M. (2016) Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes, *Sci. Rep.*, **6**, 24032, doi: 10.1038/srep24032.
 46. Rodin, A., Morozov, A., Andreeva, N., Funikov, S., Burov, A., Belyavsky, A., and Karpov, V. (2021) Reorganization of the proteasome pool in mesenchymal stem cells during aging in culture. Abstract, *FEBS Open Bio*, **11**, 345, doi: 10.1002/2211-5463.13205.
 47. Kniepert, A., and Groettrup, M. (2014) The unique functions of tissue-specific proteasomes, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 17-24, doi: 10.1016/j.tibs.2013.10.004.
 48. Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007) Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes, *Science*, **316**, 1349-1353, doi: 10.1126/science.1141915.
 49. Kincaid, E. Z., Murata, S., Tanaka, K., and Rock, K. L. (2016) Specialized proteasome subunits have an essential role in the thymic selection of CD8⁺ T cells, *Nat Immunol.*, **17**, 938-945, doi: 10.1038/ni.3480.
 50. Widjaja, C. E., Olvera, J. G., Metz, P. J., Phan, A. T., Savas, J. N., de Bruin, G., Leestemaker, Y., Berkers, C. R., de Jong, A., Florea, B. I., Fisch, K., Lopez, J., Kim, S. H., Garcia, D. A., Searles, S., Bui, J. D., Chang, A. N., Yates, J. R., Goldrath, A. W., Overkleeft, H. S., Ovaa, H., and Chang, J. T. (2017) Proteasome activity regulates CD8⁺ T lymphocyte metabolism and fate specification, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3609-3623, doi: 10.1172/JCI90895.
 51. Bikorimana, J. P., El-Hachem, N., El-Kadiry, A. E., Abusarah, J., Salame, N., Shammaa, R., and Rafei, M. (2021) Thymoproteasome-expressing mesenchymal stromal cells confer protective anti-tumor immunity via cross-priming of endogenous dendritic cells, *Front. Immunol.*, **11**, 596303, doi: 10.3389/fimmu.2020.596303.
 52. Ciechanover, A. (2005) Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting, *Cell Death Differ.*, **12**, 1178-1190, doi: 10.1038/sj.cdd.4401692.
 53. Yamanaka, S. (2012) Induced pluripotent stem cells: past, present, and future, *Cell Stem Cell*, **10**, 678-684, doi: 10.1016/j.stem.2012.05.005.
 54. Kim, S. H., Kim, M. O., Cho, Y. Y., Yao, K., Kim, D. J., Jeong, C. H., Yu, D. H., Bae, K. B., Cho, E. J., Jung, S. K., Lee, M. H., Chen, H., Kim, J. Y., Bode, A. M., and Dong, Z. (2014) ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal, *Stem Cell Res.*, **13**, 1-11, doi: 10.1016/j.scr.2014.04.001.
 55. Buckley, S. M., Aranda-Orgilles, B., Strikoudis, A., Apostolou, E., Loizou, E., Moran-Crusio, K., Farnsworth, C. L., Koller, A. A., Dasgupta, R., Silva, J. C., Stadtfeld, M., Hochedlinger, K., Chen, E. I., and Aifantis, I. (2012) Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin-proteasome system, *Cell Stem Cell*, **11**, 783-798, doi: 10.1016/j.stem.2012.09.011.
 56. Vilchez, D., Boyer, L., Morante, I., Lutz, M., Merkwirth, C., Joyce, D., Spencer, B., Page, L., Masliah, E., Berggren, W. T., Gage, F. H., and Dillin, D. (2011) Proteasome activity is essential for pluripotency and self-renewal of mouse embryonic stem cells, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 115-122, doi: 10.1038/ncb2188.

- A. (2012) Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11, *Nature*, **489**, 304-308, doi: 10.1038/nature11468.
57. Kitajima, Y., Suzuki, N., Nunomiya, A., Osana, S., Yoshioka, K., Tashiro, Y., Takahashi, R., Ono, Y., Aoki, M., and Nagatomi, R. (2018) The ubiquitin-proteasome system is indispensable for the maintenance of muscle stem cells, *Stem Cell Rep.*, **11**, 1523-1538, doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.009.
58. Saez, I., Koyuncu, S., Gutierrez-Garcia, R., Dieterich, C., and Vilchez, D. (2018) Insights into the ubiquitin-proteasome system of human embryonic stem cells, *Sci. Rep.*, **8**, 4092, doi: 10.1038/s41598-018-22384-9.
59. Jin, J., Liu, J., Chen, C., Liu, Z., Jiang, C., Chu, H., Pan, W., Wang, X., Zhang, L., Li, B., Jiang, C., Ge, X., Xie, X., and Wang, P. (2016) The deubiquitinase USP21 maintains the stemness of mouse embryonic stem cells via stabilization of Nanog, *Nat. Commun.*, **7**, 13594, doi: 10.1038/ncomms13594.
60. Huang, Z., Wu, Q., Guryanova, O. A., Cheng, L., Shou, W., Rich, J. N., and Bao, S. (2011) Deubiquitylase HAUSP stabilizes REST and promotes maintenance of neural progenitor cells, *Nat. Cell. Biol.*, **13**, 142-152, doi: 10.1038/ncb2153.
61. Fuchs, G., Shema, E., Vesterman, R., Kotler, E., Wolchinsky, Z., Wilder, S., Golomb, L., Pribluda, A., Zhang, F., Haj-Yahya, M., Feldmesser, E., Brik, A., Yu, X., Hanna, J., Aberdam, D., Domany, E., and Oren, M. (2015) RNF20 and USP44 regulate stem cell differentiation by modulating H2B monoubiquitylation, *Mol. Cell.*, **46**, 662-673, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.023.
62. Sussman, R. T., Stanek, T. J., Estes, P., Gearhart, J. D., Knudsen, K. E., and McMahon, S. B. (2013) The epigenetic modifier ubiquitin-specific protease 22 (USP22) regulates embryonic stem cell differentiation via transcriptional repression of sex-determining region Y-box 2 (SOX2), *J. Biol. Chem.*, **288**, 24234-24246, doi: 10.1074/jbc.M113.469783.
63. Raynes, R., Pomatto, L. C., and Davies, K. J. (2016) Degradation of oxidized proteins by the proteasome: distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways, *Mol. Aspects Med.*, **50**, 41-55, doi: 10.1016/j.mam.2016.05.001.
64. Lu, L., Song, H. F., Zhang, W. G., Liu, X. Q., Zhu, Q., Cheng, X. L., Yang, G. J., Li, A., and Xiao, Z. C. (2012) Potential role of 20S proteasome in maintaining stem cell integrity of human bone marrow stromal cells in prolonged culture expansion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **422**, 121-127, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.119.
65. Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato, K., Canty, J. M., and Lee, T. (2005) Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture, *J. Cell. Physiol.*, **205**, 194-201, doi: 10.1002/jcp.20376.
66. Kapetanou, M., Chondrogianni, N., Petrakis, S., Koliakos, G., and Gonos, E. S. (2017) Proteasome activation enhances stemness and lifespan of human mesenchymal stem cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **103**, 226-235, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.035.
67. Strikoudis, A., Guillaumot, M., and Aifantis, I. (2014) Regulation of stem cell function by protein ubiquitylation, *EMBO Rep.*, **15**, 365-382, doi: 10.1002/embr.201338373.
68. Rathinam, C., Thien, C. B., Langdon, W. Y., Gu, H., and Flavell, R. A. (2008) The E3 ubiquitin ligase c-Cbl restricts development and functions of hematopoietic stem cells, *Genes Dev.*, **22**, 992-997, doi: 10.1101/gad.1651408.
69. Han, G., Li, A. G., Liang, Y. Y., Owens, P., He, W., Lu, S., Yoshimatsu, Y., Wang, D., Ten Dijke, P., Lin, X., and Wang, X. J. (2006) Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development, *Dev. Cell*, **11**, 301-312, doi: 10.1016/j.devcel.2006.06.014.
70. Karpiuk, O., Najafova, Z., Kramer, F., Hennion, M., Galonska, C., König, A., Snaidero, N., Vogel, T., Shchebet, A., Begus-Nahrman, Y., Kassem, M., Simons, M., Shcherbata, H., Beissbarth, T., and Johnsen, S. A. (2012) The histone H2B monoubiquitination regulatory pathway is required for differentiation of multipotent stem cells, *Mol. Cell*, **46**, 705-713, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.022.
71. Shema, E., Tirosh, I., Aylon, Y., Huang, J., Ye, C., Moskovits, N., Raver-Shapira, N., Minsky, N., Pirngruber, J., Tarcic, G., Hublarova, P., Moyal, L., Gana-Weisz, M., Shiloh, Y., Yarden, Y., Johnsen, S. A., Vojtesek, B., Berger, S. L., and Oren, M. (2008) The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression, *Genes Dev.*, **22**, 2664-2476, doi: 10.1101/gad.1703008.
72. Hernebring, M., Fredriksson, Å., Liljevald, M., Cvijovic, M., Norrman, K., Wiseman, J., Semb, H., and Nyström, T. (2013) Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28, *Sci. Rep.*, **3**, 1381, doi: 10.1038/srep01381.
73. Balayan, V., and Guddati, A. K. (2022) Tumor dormancy: biologic and therapeutic implications, *World J. Oncol.*, **13**, 8-19, doi: 10.14740/wjon1419.
74. Lenos, K. J., and Vermeulen, L. (2016) Cancer stem cells don't waste their time cleaning-low proteasome activity, a marker for cancer stem cell function, *Ann. Transl. Med.*, **4**, 519, doi: 10.21037/atm.2016.11.81.
75. Voutsadakis, I. A. (2017) Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells, *Tumour Biol.*, **39**, 1010428317692248, doi: 10.1177/1010428317692248.
76. Mossallam, G. I., Fattah, R. A., Bokhary, M., Moneer, M., and Mahmoud, H. K. (2021) LMP7 polymorphism may modify the presentation and clin-

- ical impact of minor histocompatibility antigens in matched related hematopoietic stem cell transplantation, *Cell Immunol.*, **364**, 104329, doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104329.
77. Schröter, F., and Adjaye, J. (2014) The proteasome complex and the maintenance of pluripotency: sustain the fate by mopping up? *Stem Cell Res. Ther.*, **5**, 24, doi: 10.1186/scrt413.

ROLE OF UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM IN STEM CELL BIOLOGY

Review

A. V. Burov, A. A. Rodin, V. L. Karpov, and A. V. Morozov*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: runkel@inbox.ru*

Selective degradation of cellular proteins by the ubiquitin –proteasome system is one of the key regulatory mechanisms in eukaryotic cells. Accumulating data indicate that the ubiquitin – proteasome system is involved in the regulation of fundamental processes in mammalian stem cells, including proliferation, differentiation, cell migration, aging and programmed cell death. Regulation can be carried out either by proteolytic degradation of key transcription factors and signaling pathway proteins, or by posttranslational modifications of target proteins with ubiquitin or other ubiquitin-like modifiers. Studies of the molecular mechanisms of proteostasis maintenance in stem cells are of great importance for the development of new therapeutic approaches aimed at the treatment of autoimmune and neurodegenerative diseases, cancer and other socially significant pathologies. This review covers current data on the function of the ubiquitin-proteasome system in stem cells.

Keywords: stem cells, ubiquitin-proteasome system, proteasome

РОЛЬ КИНАЗЫ *AURORA B* В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Обзор

© 2023 Е.В. Титова^{1*}, Г.С. Шагиева¹, В.Б. Дугина^{1,2}, П.Б. Копнин³

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: ekaterina.v.titova@gmail.com

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

³ НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.09.2023

После доработки 22.10.2023

Принята к публикации 28.10.2023

Киназы семейства *Aurora* имеют важное значение в процессе клеточного деления у млекопитающих. Среди внутриклеточных событий, в которых киназы *Aurora* принимают участие, можно отметить регуляцию динамики веретена деления, контроль взаимодействия микротрубочек с кинетохорами, конденсацию и ориентацию хромосом при клеточном делении. У млекопитающих выделяют, по крайней мере, три киназы семейства *Aurora* – А, В, С. Было показано, что *Aurora B* необходима для поддержания геномной стабильности и нормального клеточного деления. Мутации и нарушения регуляции этой киназы связывают с развитием и прогрессией опухолей. В данном обзоре мы рассмотрим функции *Aurora B*, связь повышенной активности *Aurora B* с канцерогенезом и перспективы использования ингибиторов киназы *Aurora B* в противоопухолевой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Aurora B*, клеточный цикл, митоз, канцерогенез, ингибиторы *Aurora B*.

DOI: 10.31857/S0320972523120072, **EDN:** NKFSKU

ВВЕДЕНИЕ

Серин/треониновые протеинкиназы семейства *Aurora* играют важную роль в различных процессах в ходе клеточного деления. Они участвуют в регуляции организации веретена деления, взаимодействия микротрубочек и кинетохора, формирования метафазной пластинки, конденсации и ориентации хромосом. Киназы этого семейства также необходимы для корректного прохождения процесса цитокинеза. *Aurora* у человека были выявлены в рамках ПЦР-скрининга новых киназ, связанных с раком толстой кишки [1], в то время как их гомологи были описаны ранее у *Drosophila melanogaster* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [2, 3].

В клетках млекопитающих встречаются по меньшей мере три киназы *Aurora*: А, В и С, каждая из которых кодируется своим геном: *AURKA* (*Aurora A*) – расположен на хромосоме 20, *AURKB* (*Aurora B*) – на хромосоме 17, *AURKC* (*Aurora C*) – на хромосоме 19. Несмотря на то что три паралога схожи по последовательности, особенно в своих каталитических С-концевых доменах, они значительно отличаются по N-концевым доменам [4].

Локализация *Aurora A* на центросомах свидетельствует о том, что данная киназа регулирует функцию центросом в процессе сборки митотического веретена. *Aurora A* связана с центросомой с момента дубликации центросом до завершения митоза. Помимо этого,

Принятые сокращения: CPC – chromosomal passenger complex, хромосомный пассажирский комплекс; INCENP – inner centromere protein, белок внутренней центромерной области; SAC – spindle assembly checkpoint, митотическая контрольная точка сборки веретена деления.

* Адресат для корреспонденции.

при митозе она располагается на концах микротрубочек, обращённых к centrosомам [5].

У человека Aurora B вместе с тремя другими белками формирует большой комплекс CPC (chromosomal passenger complex, хромосомный пассажирский комплекс), связанный с хромосомами в ходе клеточного деления [6]. Локализация CPC меняется на разных стадиях митоза и цитокинеза, обеспечивая правильное разделение хромосом, инвагинацию цитоплазмы, формирование и стабилизацию веретена деления, сборку ядерной оболочки и завершение цитокинеза. Активность Aurora B регулируется различными механизмами, в том числе фосфорилированием, белок-белковыми взаимодействиями [7, 8].

Киназа Aurora C обнаружена исключительно у млекопитающих, где её экспрессия максимальна в семенниках. Уровень белка Aurora C остаётся низким в течение S-фазы и достигает пика во время митоза [9]. Киназа локализуется в centrosомах, начиная с анафазы и заканчивая телофазой, взаимодействует с сурвином и INCENP (inner centromere protein, белок внутренней центромерной области) и служит каталитическим компонентом CPC вместе с Aurora B [10].

Несмотря на сходство, каждая киназа Aurora имеет специфические функции и локализацию во время клеточного цикла. Киназы данного семейства являются многообещающими мишенями для противоопухолевой терапии ввиду того, что их экспрессия и/или активность часто повышена в определённых типах опухолей. Предполагается, что они способствуют развитию и прогрессии опухолей, стимулируя аномальное клеточное деление и геномную нестабильность.

В данном обзоре мы рассмотрим функции киназы Aurora B в нормальных клетках и нарушения этих функций, связанные с опухолевой трансформацией. Также будут рассмотрены перспективы использования существующих ингибиторов Aurora B для противоопухолевой терапии.

AURORA B – СУБЪЕДИНИЦА CPC

Динамическая локализация Aurora B в различных областях клетки необходима для её правильного функционирования во время митоза и цитокинеза (рис. 1). В начале митоза она находится во внутренней области цен-

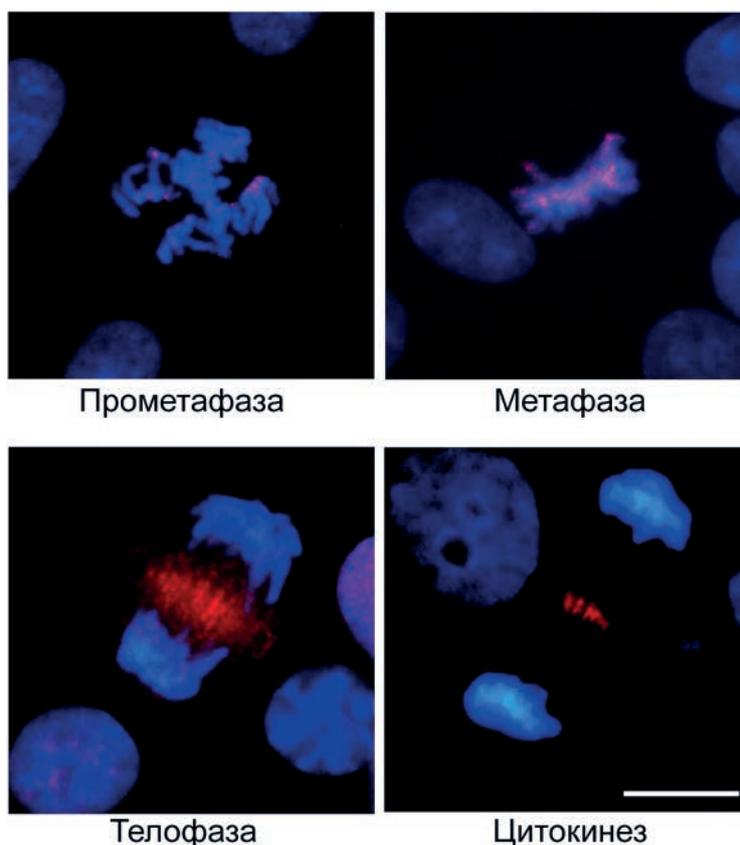


Рис. 1. Распределение Aurora B в различных фазах митоза и цитокинезе в эпителиальных клетках IAR2. Синий цвет – ДНК (DAPI), красный – окрашивание антителами к Aurora B, масштаб – 10 мкм. Иммунофлуоресцентное окрашивание согласно методике Titova et al., 2018 [21]

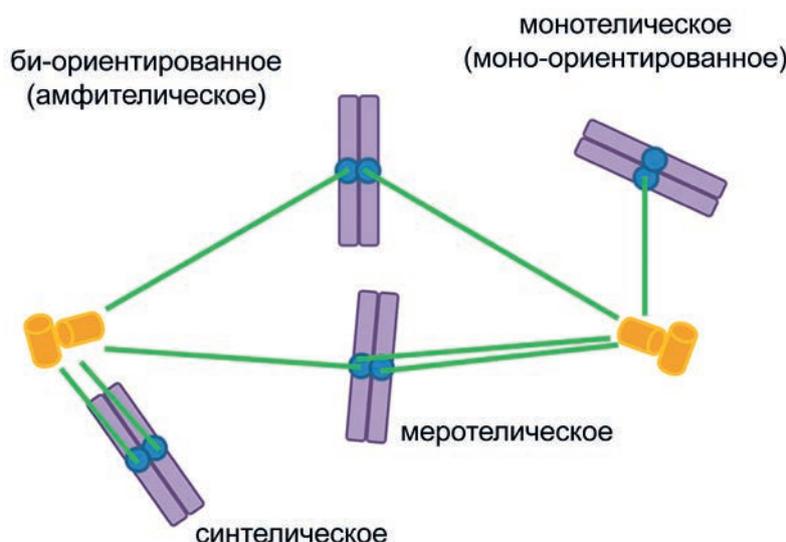


Рис. 2. Виды взаимодействия микротрубочек веретена деления с кинетохорами сестринских хроматид в делящейся клетке. Амфителическое (би-ориентированное) взаимодействие является корректным и обеспечивает правильное распределение генетического материала между дочерними клетками и прогрессии деления клетки. Синтелическое, меротелическое и монотелическое (моно-ориентированное) взаимодействия являются патологическими и приводят к включению SAC, при этом деление клетки приостанавливается до исправления ошибочных взаимодействий

тромеры, где фосфорилирует гистон H3 и рекрутирует другие белки большого белкового комплекса CPC. *Aurora B* является ферментативным компонентом этого комплекса. Ферментативная функция *Aurora B* заключается в фосфорилировании различных субстратов на митотических хромосомах для обеспечения правильной сегрегации хромосом. CPC также содержит три других белка: сурвивин (survivin), бореалин (borealin) и INCENP [6, 11]. Бореалин и сурвивин отвечают за правильную локализацию комплекса внутри клетки [6, 11, 12]. INCENP имеет два функциональных участка: N-концевая часть отвечает за связывание с бореалином и сурвивином и ориентацией в области центромеры, C-концевая часть необходима для правильной локализации и киназной активности *Aurora B* [13, 14].

CPC участвует в ряде митотических процессов, включая конденсацию хроматина, когезию центромер, прикрепление кинетохоров к микротрубочкам, регуляцию митотической контрольной точки сборки веретена (SAC, spindle assembly checkpoint), инвагинацию цитоплазмы при цитокинезе [15, 16].

Правильное пространственно-временное расположение комплекса CPC необходимо для нормального прохождения процесса клеточного деления [17]. Начиная со стадии поздней прометафазы и до метафазы CPC локализуется в центромерах благодаря взаимодействию INCENP с фосфорилированными гистонами: H3 – по Thr3 и H2A – по Thr120. Эти взаимодействия поддерживаются сурвивином и

бореалином [12]. Кроме того, небольшая популяция каталитически активной *Aurora B* в прометафазе обнаруживается на кинетохорах [18, 19]. Анализ экзогенной *Aurora B*, связанной с GFP (green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок) в живых клетках млекопитающих, показал, что её взаимодействие с центромерами в метафазе является динамичным: белок непрерывно обменивается с окружающим цитоплазматическим пулом [20]. После начала анафазы CPC перемещается в центральную зону веретена деления и затем локализуется в срединном тельце в телофазе, играя решающую роль в цитокинезе, содействуя сборке сократительного кольца и финальной стадии цитокинеза – абсциссии. Транслокация CPC в центральную зону веретена деления требует дефосфорилирования гистона H2A по Thr3 и Cdk1 внутри INCENP и Mklp2 [17].

УЧАСТИЕ *AURORA B* В РЕГУЛЯЦИИ ОРИЕНТАЦИИ ХРОМОСОМ

В прометафазе митоза *Aurora B* как часть CPC концентрируется в проксимальной области центромер и кинетохоров (рис. 1), в местах, где хромосомы присоединяются к микротрубочкам веретена. Эта локализация важна для стабилизации кинетохора, прикрепления кинетохоров к микротрубочкам и прохождения SAC. После дубликации хромосом в интерфазе сестринские хроматиды должны быть

правильно ориентированы на веретене деления, чтобы обеспечить их равномерное распределение по дочерним клеткам. Данный процесс, известный как «би-ориентация» (рис. 2), требует стабильных перпендикулярно-ориентированных взаимодействий между кинетохорами сестринских хроматид и микротрубочками веретена, исходящими из противоположных полюсов делящейся материнской клетки [22, 23].

Aurora B участвует в двух важных механизмах обратной связи, регулирующих взаимодействие кинетохоров с микротрубочками во время митоза: механизм коррекции ошибок и SAC. Коррекция ошибок — это локальный механизм проверки, который позволяет избирательно стабилизировать взаимодействие кинетохоров с микротрубочками. Этот процесс способствует правильной би-ориентации хромосом и устраняет неверные взаимодействия, такие как синтелические и меротелические (рис. 2), которые представляют собой различные варианты нарушения схемы прикрепления нитей веретена деления к кинетохорам дочерних хроматид [24].

Предполагается, что коррекция ошибок зависит от способности системы кинетохор-центромера обнаруживать напряжение, связанное с би-ориентацией, или отсутствие напряжения, связанное с отсутствием би-ориентации. Коррекция осуществляется, когда кинетохоры, связанные с микротрубочками, не способны создавать напряжение, как это наблюдается при синтелических или меротелических прикреплениях. Количество меротелических и синтелических взаимодействий увеличивается в случае нарушения активности Aurora B. Aurora B является ключевым компонентом процесса коррекции ошибок [25, 26].

УЧАСТИЕ *AURORA B* В КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКЕ СБОРКИ ВЕРЕТЕНА SAC

SAC обеспечивает правильное выравнивание хромосом перед делением клетки и предотвращает завершение митоза при наличии хотя бы одного неприкрепленного или аномально прикрепленного к микротрубочкам кинетохора [27]. Aurora B участвует в сигнальном пути SAC, фосфорилируя связанные с наружным кинетохором белки, в том числе Hec1 — компонент комплекса NDC80, который связывает кинетохоры непосредственно с микротрубочками [28, 29]. Фосфорилирование Hec1 снижает стабильность прикрепления кинетохоров к микротрубочкам за счёт уменьшения средства комплекса NDC80 к мик-

ротрубочкам [30, 31]. В ходе митоза по мере би-ориентации хромосом происходит снижение фосфорилирования Hec1 и других внешних белков кинетохора, опосредованное изменением активности Aurora B. В результате этого усиливается стабилизация связи между кинетохорами и микротрубочками, что способствует конгрессии — движению хромосом в сторону экваториальной части веретена с образованием метафазной пластинки и прохождению SAC [30–32].

В случае нарушения прикрепления кинетохора к микротрубочкам делящаяся клетка не проходит SAC и клеточный цикл приостанавливается. При этом подавляется активность CDC20 и предотвращается опосредованное APC (anaphase promoting complex, активирующий анафазу комплекс) полиубиквитинирование циклина B и секуринов. SAC достигает этого путём регуляции CDC20, тем самым продлевая прометафазу до тех пор, пока все хромосомы на метафазной пластинке не станут би-ориентированными [33].

AURORA B УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ЗАВЕРШЕНИЯ ЦИТОКИНЕЗА

Для обеспечения точного распределения генетического материала от родительской клетки к дочерним во время деления процесс завершения цитокинеза — абсцизия — должен быть точно скоординирован с сегрегацией хромосом [34]. В ответ на дефекты сегрегации хромосом, приводящие к появлению отстающих хромосом или хроматиновых мостиков (например, нитей неверно разделённого хроматина, соединяющих анафазные полюса или дочерние ядра) [35], эукариотические клетки задерживают абсцизию, чтобы избежать разрыва хроматина или полиплоидизации, вызванной регрессией борозды деления [36]. Aurora B участвует в регуляции нескольких белков, локализующихся в борозде деления, включая белки промежуточных филаментов — виментин, десмин и глиальный фибриллярный кислый белок [37].

Заключительный этап цитокинеза, в ходе которого узкий межклеточный канал, соединяющий две дочерние клетки, закрывается, требует перестройки плазматической мембраны, а также реорганизации цитоскелета внутри межклеточного канала [34]. Эволюционно консервативный механизм ESCRT (endosomal sorting complex required for transport, эндосомальный сортировочный комплекс, необходи-

мый для транспорта), который способствует перестройкам мембраны во время формирования мультивезикулярных тел, захвата вирусом фрагмента клеточной мембраны при проникновении в клетку или во время сборки ядерной оболочки после завершения митоза, также участвует в реконструкции мембраны во время абсциссии [38]. Для таких изменений клеточной мембраны в зоне абсциссии необходимо связывание ESCRT с АТФазой Vps4. Киназа Aurora B подавляет правильную локализацию и функцию Vps4 в срединном тельце в нормально сегрегирующих клетках. Последующее снижение каталитической активности Aurora B отвечает за успешную абсциссию.

ИЗМЕНЕНИЯ *AURORA B* В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Как белок, участвующий в ключевых митотических процессах, Aurora B чрезвычайно важна для поддержания геномной стабильности и правильного клеточного деления. В ряде случаев при опухолевой трансформации клеток наблюдаются изменения в экспрессии и регуляции активности данной киназы и связанных с этим молекулярных механизмов [39]. Мутации или нарушения регуляции Aurora B могут приводить к нестабильности генома и анеуплоидии [40], которые являются отличительными признаками опухолевых заболеваний. Ряд исследований связывает Aurora B с развитием и прогрессией неоплазий. Повышенная экспрессия и/или активность Aurora B наблюдается в различных типах опухолей: немелкоклеточной карциноме лёгких [41, 42], карциноме щитовидной железы [43], раке молочной железы [44], простаты [45], раке толстой и прямой кишки [46]. Лекарственная устойчивость к химиотерапии зависит от экспрессии Aurora B в различных типах опухолей [47] и от мутаций в домене Aurora B, как показано в ряде исследований *in vitro* [48, 49].

Повышенная экспрессия Aurora B в опухолевых клетках приводит к анеуплоидии и промоции клеточного цикла. Экспрессия киназы в опухолевых клетках регулируется такими молекулами, как циклин К, с-Мус, MYCN, MDM2. Онкогены Мус (с-Мус, MYCN) играют важнейшую роль в канцерогенезе. Было показано, что с-Мус влияет на экспрессию Aurora B, и повышенный уровень киназы Aurora наблюдается в В-клеточных лимфомах, вызванных Мус [50]. MYCN отвечает за высокий уровень Aurora B в клетках ретинобластомы [51] и нейробластомы [52] человека.

Снижение уровня широко известного опухолевого супрессора p53 приводит к подавлению другого опухолевого супрессора, FBXW7, что в итоге увеличивает экспрессию Aurora B [53]. В свою очередь, Aurora B понижает активность p53 путём фосфорилирования, приводя к активации циклин-зависимой киназы 1 (Cdk1) и способствуя выживанию опухолевых клеток за счёт прогрессии клеточного цикла [54]. Cdk1 также активирует Aurora B, стимулируя анеуплоидию и аномальную пролиферацию. MDM2 – важный онкопротеин, влияющий на прогрессию клеточного цикла через сигнальные пути Aurora B и Cdk1 при раке предстательной железы [55]. Для данного типа рака было выявлено, что, используя сигнальные пути Aurora B, циклин К способствует пролиферации опухолевых клеток и ингибирует их гибель [56].

Таким образом, киназа Aurora B является перспективной мишенью для противоопухолевой терапии.

ИНГИБИТОРЫ КИНАЗЫ *AURORA B* В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

В настоящее время разработано несколько низкомолекулярных ингибиторов Aurora B, которые проходят клинические испытания в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов. Эти ингибиторы нацелены на подавление активности Aurora B, снижая аутофосфорилирование киназы и фосфорилирование гистона H3 [57], что приводит к остановке клеточного цикла (в основном в фазе G2/M) и апоптозу раковых клеток [51, 56, 58].

Ранее было показано, что воздействие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 снижает уровень Aurora B и фосфорилированных форм киназ Aurora A/B/C в опухолевых клетках фибросаркомы человека HT1080 [21]. Вероятно, удаление митохондриальных активных форм кислорода с помощью SkQ1 влияет на сигнальные пути Rho в линии HT1080, что, в свою очередь, вызывает снижение активности Aurora B, появление многоядерных клеток и подавление роста опухолевых клеток. Также полученные данные указывают на регуляторную функцию Aurora C при митозе в клетках с активированным онкогеном N-RAS.

На сегодняшний день более пятидесяти ингибиторов Aurora B прошли или проходят клинические испытания [59]. Большинство низкомолекулярных ингибиторов Aurora B, уча-

ствующих в клинических исследованиях, представляют собой производные различных оснований, конкурирующих с АТФ, такие как азаиндол (для GSK1070916), 3-аминопиразол (для РНА-739358, или Данусертиба), пиразолохиназол (для AZD1152, или Барасертиба), 4,6-диаминопиримидин (для VX-680, или Тозасертиба), пиразол-бензимидазол (для AT9283). Эти ингибиторы демонстрируют высокую селективность в отношении Aurora B. *In vitro* GSK1070916 подавлял пролиферацию клеток рака лёгкого, а CS2164 (Чиаураниб) – клеток рака толстой и прямой кишки, острого лимфобластного лейкоза [60, 61]. Исследования *in vivo* на мышинных ксенографтах показали высокий противоопухолевый потенциал ингибиторов Aurora B для различных опухолей: GSK1070916 – при раке толстой кишки, молочной железы и лёгкого [60], CS2164 – при раке толстой и прямой кишки [61].

Учитывая важную роль Aurora B в регуляции митоза, можно ожидать, что ингибирование данной киназы оказывает влияние и на клеточный цикл в нормальных клетках организма. Большинство клеток человека не пролиферируют с большой скоростью, однако активно делящиеся клетки (гемопоэтические, эпителий слизистых) действительно испытывают сильный токсический эффект в результате воздействия ингибиторов Aurora B. В том числе поэтому первоначальные попытки использовать ингибиторы киназ семейства Aurora (особенно первого поколения) в лечении солидных опухолей оказались не очень успешными, была показана их высокая токсичность и ограниченная эффективность действия [62]. В клинически эффективных дозах чаще всего наблюдались гематологическая и гастроинтестинальная токсичность [63–68]. В клинических испытаниях на солидных опухолях, клетки которых имеют относительно низкую скорость пролиферации, была показана низкая эффективность ингибиторов киназ Aurora. Это может быть связано с необходимостью длительного присутствия препарата в организме (в течение нескольких клеточных циклов), чтобы максимально воздействовать на опухолевые клетки. При этом воздействие ингибиторов на быстро пролиферирующие клетки костного мозга было сильным, вплоть до появления тяжёлых токсических эффектов, таких как нейтропения. Однако полученные результаты лечения солидных опухолей привели к изменению стратегий. Ингибиторы киназ Aurora стали успешно использовать в клинических испытаниях против гематологи-

ческих злокачественных опухолей, которые более гомогенны и имеют высокую скорость пролиферации по сравнению с солидными опухолями [67, 69, 70]. Было также показано, что ингибиторы Aurora B сенсibiliзируют опухолевые клетки к различным химио- и радиотерапевтическим агентам [71, 72], способствуют снижению устойчивости раковых клеток к облучению [73, 74]. Поэтому ингибиторы Aurora B могут оказаться эффективными не только в роли первичных химиотерапевтических агентов, но и в сочетании с другими стратегиями противоопухолевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении важно отметить, что Aurora B играет критическую роль в регуляции митоза, цитокинеза и поддержании геномной стабильности клеток. Нарушение регуляции этой киназы может способствовать трансформации нормальных клеток и стимулировать канцерогенез. Исследования в этой области помогут более глубоко понять молекулярные механизмы клеточного деления и открыть пути к новым методам лечения опухолевых заболеваний. Дальнейшие исследования по поиску узкоспецифичных ингибиторов Aurora B позволят детально изучить функцию киназы в возникновении неопластической трансформации нормальных клеток человека, оценить её влияние на прогрессию опухолей, метастазирование и развитие множественной лекарственной устойчивости в процессе противоопухолевой терапии. Также перспективным направлением может быть изучение совместной роли в канцерогенезе Aurora B и других протеинкиназ данного семейства, поиск направленных на несколько киназ Aurora ингибиторов, изучение эффективности таких ингибиторов в качестве противоопухолевых агентов.

Вклад авторов. В.Д. – концепция и руководство; Е.Т, Г.Ш. – написание текста; Г.Ш., П.К. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00433, <https://rscf.ru/project/23-15-00433/>.

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

- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C. S., Novotny, M., Slamon, D. J., and Plowman, G. D. (1998) A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, *EMBO J.*, **17**, 3052-3065, doi: 10.1093/EMBOJ/17.11.3052.
- Francisco, L., Wang, W., and Chan, C. S. (1994) Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4731-4740, doi: 10.1128/MCB.14.7.4731-4740.1994.
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., and Parry, H. (1995) Mutations in *aurora* prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles, *Cell*, **81**, 95-105, doi: 10.1016/0092-8674(95)90374-7.
- Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., and Zhang, C. (2007) Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis, *Mol. Cancer Res.*, **5**, 1-10, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0208.
- Sugimoto, K., Urano, T., Zushi, H., Inoue, K., Tasaka, H., Tachibana, M., and Dotsu, M. (2002) Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin α , *Cell Structure Funct.*, **27**, 457-467, doi: 10.1247/CSF.27.457.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W. C. (2012) The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 789-803, doi: 10.1038/NRM3474.
- Broad, A. J., and DeLuca, J. G. (2020) The right place at the right time: Aurora B kinase localization to centromeres and kinetochores, *Essays Biochem.*, **64**, 299-311, doi: 10.1042/EBC20190081.
- Ahmed, A., Shamsi, A., Mohammad, T., Hasan, G. M., Islam, A., and Hassan, M. I. (2021) Aurora B kinase: a potential drug target for cancer therapy, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **147**, 2187-2198, doi: 10.1007/S00432-021-03669-5.
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., and Okano, Y. (1999) Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3, *J. Biol. Chem.*, **274**, 7334-7340, doi: 10.1074/JBC.274.11.7334.
- Sasai, K., Katayama, H., Hawke, D. H., and Sen, S. (2016) Aurora-C interactions with survivin and INCENP reveal shared and distinct features compared with Aurora-B chromosome passenger protein complex, *PLoS One*, **11**, e0157305, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0157305.
- Vader, G., Medema, R. H., and Lens, S. M. A. (2006) The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis, *J. Cell Biol.*, **173**, 833-837, doi: 10.1083/JCB.200604032.
- Hindriksen, S., Lens, S. M. A., and Hadders, M. A. (2017) The ins and outs of Aurora B inner centromere localization, *Front. Cell Dev. Biol.*, **5**, 112, doi: 10.3389/FCELL.2017.00112.
- Bishop, J. D., and Schuniacher, J. M. (2002) Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 27577-27580, doi: 10.1074/JBC.C200307200.
- Honda, R., Körner, R., and Nigg, E. A. (2003) Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3325-3341, doi: 10.1091/MBC.E02-11-0769.
- McVey, S. L., Cosby, J. K., and Nannas, N. J. (2021) Aurora B tension sensing mechanisms in the kinetochore ensure accurate chromosome segregation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8818, doi: 10.3390/IJMS22168818.
- Krenn, V., and Musacchio, A. (2015) The Aurora B kinase in chromosome bi-orientation and spindle checkpoint signaling, *Front. Oncol.*, **5**, 225, doi: 10.3389/FONC.2015.00225.
- Van der Horst, A., Vromans, M. J. M., Bouwman, K., van der Waal, M. S., Hadders, M. A., and Lens, S. M. A. (2015) Inter-domain cooperation in INCENP promotes Aurora B relocation from centromeres to microtubules, *Cell Rep.*, **12**, 380-387, doi: 10.1016/J.CELREP.2015.06.038.
- Caldas, G. V., DeLuca, K. F., and DeLuca, J. G. (2013) KNL1 facilitates phosphorylation of outer kinetochore proteins by promoting Aurora B kinase activity, *J. Cell Biol.*, **203**, 957-969, doi: 10.1083/JCB.201306054.
- Hadders, M. A., Hindriksen, S., Truong, M. A., Mhaskar, A. N., Pepijn Wopken, J., Vromans, M. J. M., and Lens, S. M. A. (2020) Untangling the contribution of Haspin and Bub1 to Aurora B function during mitosis, *J. Cell Biol.*, **219**, e201907087, doi: 10.1083/JCB.201907087.
- Murata-Hori, M., Tatsuka, M., and Wang, Y. L. (2002) Probing the dynamics and functions of aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis, *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1099-1108, doi: 10.1091/MBC.01-09-0467.
- Titova, E., Shagieva, G., Ivanova, O., Domnina, L., Domninskaya, M., Strelkova, O., Khromova, N., Kopnin, P., Chernyak, B., Skulachev, V., and Dugina, V. (2018) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth, *Cell Cycle*, **17**, 1797-1811, doi: 10.1080/15384101.2018.1496748.
- Duro, E., and Marston, A. L. (2015) From equator to pole: splitting chromosomes in mitosis and meiosis, *Genes Dev.*, **29**, 109-122, doi: 10.1101/gad.255554.114.

23. Foley, E. A., and Kapoor, T. M. (2013) Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 25-37, doi: 10.1038/NRM3494.
24. Nezi, L., and Musacchio, A. (2009) Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 785-795, doi: 10.1016/j.ceb.2009.09.007.
25. Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L., and Peters, J.-M. (2003) The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint, *J. Cell Biol.*, **161**, 281-294, doi: 10.1083/jcb.200208092.
26. Sen, O., Harrison, J. U., Burroughs, N. J., and McAinsh, A. D. (2021) Kinetochore life histories reveal an Aurora-B-dependent error correction mechanism in anaphase, *Dev. Cell*, **56**, 3082, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2021.10.007.
27. Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995) The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores, *J. Cell Biol.*, **130**, 941-948, doi: 10.1083/JCB.130.4.941.
28. DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2006) Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1, *Cell*, **127**, 969-982, doi: 10.1016/J.CELL.2006.09.047.
29. DeLuca, J. G., and Musacchio, A. (2012) Structural organization of the kinetochore-microtubule interface, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **24**, 48-56, doi: 10.1016/J.CEB.2011.11.003.
30. DeLuca, K. F., Lens, S. M. A., and DeLuca, J. G. (2011) Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis, *J. Cell Sci.*, **124**, 622-634, doi: 10.1242/jcs.072629.
31. Yoo, T. Y., Choi, J. M., Conway, W., Yu, C. H., Pappu, R. V., and Needleman, D. J. (2018) Measuring NDC80 binding reveals the molecular basis of tension-dependent kinetochore-microtubule attachments, *eLife*, **7**, e36392, doi: 10.7554/ELIFE.36392.
32. Etemad, B., Kuijt, T. E. F., and Kops, G. J. P. L. (2015) Kinetochore-microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint, *Nat. Commun.*, **6**, 8987, doi: 10.1038/NCOMMS9987.
33. Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 379-393, doi: 10.1038/NRM2163.
34. Mierzwa, B., and Gerlich, D. W. (2014) Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control, *Dev. Cell*, **31**, 525-538, doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.006.
35. Gisselsson, D. (2008) Classification of chromosome segregation errors in cancer, *Chromosoma*, **117**, 511-519, doi: 10.1007/S00412-008-0169-1.
36. Petsalaki, E., and Zachos, G. (2016) Clks 1, 2 and 4 prevent chromatin breakage by regulating the Aurora B-dependent abscission checkpoint, *Nat. Commun.*, **7**, 11451, doi: 10.1038/NCOMMS11451.
37. Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E. A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K., and Inagaki, M. (2003) Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process, *J. Biol. Chem.*, **278**, 8526-8530, doi: 10.1074/jbc.M210892200.
38. Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2017) Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 42-56, doi: 10.1016/J.TIBS.2016.08.016.
39. Borah, N. A., and Reddy, M. M. (2021) Aurora kinase B inhibition: a potential therapeutic strategy for cancer, *Molecules*, **26**, 1981, doi: 10.3390/molecules26071981.
40. González-Loyola, A., Fernández-Miranda, G., Trakala, M., Partida, D., Samejima, K., Ogawa, H., Cañamero, M., de Martino, A., Martínez-Ramírez, Á., de Cárcer, G., Pérez de Castro, I., Earnshaw, W. C., and Malumbres, M. (2015) Aurora B overexpression causes aneuploidy and p21Cip1 repression during tumor development, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 3566-3578, doi: 10.1128/MCB.01286-14.
41. Smith, S. L., Bowers, N. L., Betticher, D. C., Gautschi, O., Ratschiller, D., Hoban, P. R., Booton, R., Santibáñez-Koref, M. F., and Heighway, J. (2005) Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability, *Br. J. Cancer*, **93**, 719-729, doi: 10.1038/sj.bjc.6602779.
42. Vischioni, B., Oudejans, J. J., Vos, W., Rodriguez, J. A., and Giaccone, G. (2006) Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients, *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 2905-2913, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0301.
43. Sorrentino, R., Libertini, S., Pallante, P. L., Tronccone, G., Palombini, L., Bavetsias, V., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Linardopoulos, S., Chieffi, P., Fusco, A., and Portella, G. (2005) Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 928-935, doi: 10.1210/JC.2004-1518.
44. Huang, D., Huang, Y., Huang, Z., Weng, J., Zhang, S., and Gu, W. (2019) Relation of *AURKB* overexpression to low survival rate in BCRA and reversine-modulated aurora B kinase in breast cancer cell lines, *Cancer Cell Int.*, **19**, 166, doi: 10.1186/S12935-019-0885-Z.

45. Chieffi, P., Cozzolino, L., Kisslinger, A., Libertini, S., Staibano, S., Mansueto, G., De Rosa, G., Villacci, A., Vitale, M., Linardopoulos, S., Portella, G., and Tramontano, D. (2006) Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation, *Prostate*, **66**, 326-333, doi: 10.1002/PROS.20345.
46. Pohl, A., Azuma, M., Zhang, W., Yang, D., Ning, Y., Winder, T., Danenberg, K., and Lenz, H. J. (2011) Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer, *Pharmacogenom. J.*, **11**, 93-99, doi: 10.1038/TPJ.2010.18.
47. Chang, X., Zhang, T., Wang, Q., Rathore, M. G., Reddy, K., Chen, H., Shin, S. H., Ma, W. Y., Bode, A. M., and Dong, Z. (2020) HI-511 overcomes melanoma drug resistance via targeting AURKB and BRAF V600E, *Theranostics*, **10**, 9721-9740, doi: 10.7150/THNO.44342.
48. Failes, T. W., Mitic, G., Abdel-Halim, H., Po'uha, S. T., Liu, M., Hibbs, D. E., and Kavallaris, M. (2012) Evolution of resistance to Aurora kinase B inhibitors in leukaemia cells, *PLoS One*, **7**, e30734, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0030734.
49. Skaland, I., Janssen, E. A. M., Gudlaugsson, E., Hui Ru Guo, L., and Baak, J. P. A. (2009) The prognostic value of the proliferation marker Phosphohistone H3 (PPH3) in luminal, basal-like and triple negative phenotype invasive lymph node-negative breast cancer, *Cell. Oncol.*, **31**, 261-271, doi: 10.3233/clo-2009-0464.
50. Den Hollander, J., Rimpi, S., Doherty, J. R., Rudelius, M., Buck, A., Hoellein, A., Kremer, M., Graf, N., Scheerer, M., Hall, M. A., Goga, A., von Bubnoff, N., Duyster, J., Peschel, C., Cleveland, J. L., Nilsson, J. A., and Keller, U. (2010) Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state, *Blood*, **116**, 1498-1505, doi: 10.1182/BLOOD-2009-11-251074.
51. Borah, N. A., Sradhanjali, S., Barik, M. R., Jha, A., Tripathy, D., Kaliki, S., Rath, S., Raghav, S. K., Patnaik, S., Mittal, R., and Reddy, M. M. (2021) Aurora kinase B expression, its regulation and therapeutic targeting in human retinoblastoma, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **62**, 16, doi: 10.1167/IOVS.62.3.16.
52. Bogen, D., Wei, J. S., Azorsa, D. O., Ormanoglu, P., Buehler, E., Guha, R., Keller, J. M., Mathews Griner, L. A., Ferrer, M., Song, Y. K., Liao, H., Mendoza, A., Gryder, B. E., Sindri, S., He, J., Wen, X., Zhang, S., Shern, J. F., Yohe, M. E., Taschner-Mandl, S., Shohet, J. M., Thomas, C. J., Martin, S. E., Ambros, P. F., and Khan, J. (2015) Aurora B kinase is a potent and selective target in MYCN-driven neuroblastoma, *Oncotarget*, **6**, 35247-35262, doi: 10.18632/oncotarget.6208.
53. Teng, C. L., Hsieh, Y. C., Phan, L., Shin, J., Gully, C., Velazquez-Torres, G., Skerl, S., Yeung, S. C. J., Hsu, S. L., and Lee, M. H. (2012) FBXW7 is involved in Aurora B degradation, *Cell Cycle*, **11**, 4059-4068, doi: 10.4161/CC.22381.
54. Gully, C. P., Velazquez-Torres, G., Shin, J. H., Fuentes-Mattei, E., Wang, E., Carlock, C., Chen, J., Rothenberg, D., Adams, H. P., Choi, H. H., Guma, S., Phan, L., Chou, P. C., Su, C. H., Zhang, F., Chen, J. S., Yang, T. Y., Yeung, S. C. J., and Lee, M. H. (2012) Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E1513-E1522, doi: 10.1073/PNAS.1110287109.
55. Kanagasabai, T., Venkatesan, T., Natarajan, U., Alobid, S., Alhazzani, K., Algahtani, M., and Rathinavelu, A. (2020) Regulation of cell cycle by MDM2 in prostate cancer cells through Aurora Kinase-B and p21WAF1/CIP1 mediated pathways, *Cell. Signal.*, **66**, 109435, doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109435.
56. Schecher, S., Walter, B., Falkenstein, M., Macher-Goeppinger, S., Stenzel, P., Krümpelmann, K., Hadaschik, B., Perner, S., Kristiansen, G., Duensing, S., Roth, W., and Tagscherer, K. E. (2017) Cyclin K dependent regulation of Aurora B affects apoptosis and proliferation by induction of mitotic catastrophe in prostate cancer, *Int. J. Cancer*, **141**, 1643-1653, doi: 10.1002/IJC.30864.
57. Nair, J. S., Ho, A. L., Tse, A. N., Coward, J., Cheema, H., Ambrosini, G., Keen, N., Schwartz, G. K. (2009) Aurora B kinase regulates the postmitotic endoreduplication checkpoint via phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 780, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2218-2228, doi: 10.1091/MBC.E08-08-0885.
58. Hartsink-Segers, S. A., Zwaan, C. M., Exalto, C., Luijendijk, M. W. J., Calvert, V. S., Petricoin, E. F., Evans, W. E., Reinhardt, D., De Haas, V., Hedtjörn, M., Hansen, B. R., Koch, T., Caron, H. N., Pieters, R., and Den Boer, M. L. (2013) Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target, *Leukemia*, **27**, 560, doi: 10.1038/LEU.2012.256.
59. Kovacs, A. H., Zhao, D., and Hou, J. (2023) Aurora B inhibitors as cancer therapeutics, *Molecules*, **28**, 3385, doi: 10.3390/MOLECULES28083385.
60. Adams, N. D., Adams, J. L., Burgess, J. L., Chaudhari, A. M., Copeland, R. A., Donatelli, C. A., Drewry, D. H., Fisher, K. E., Hamajima, T., Hardwicke, M. A., Huffman, W. F., Koretke-Brown, K. K., Lai, Z. V., McDonald, O. B., Nakamura, H., Newlander, K. A., Oleykowski, C. A., Parrish, C. A., Patrick, D. R., Plant, R., Sarpong, M. A., Sasaki, K., Schmidt, S. J., Silva, D. J., Sutton, D., Tang, J., Thompson, C. S., Tummino, P. J., Wang, J. C., Xiang, H., Yang, J., and Dhanak, D. (2010) Discovery of GSK1070916, a potent and selective inhibitor of Aurora B/C kinase, *J. Med. Chem.*, **53**, 3973-4001, doi: 10.1021/JM901870Q.
61. Zhou, Y., Shan, S., Li, Z. B., Xin, L. J., Pan, D. S., Yang, Q. J., Liu, Y. P., Yue, X. P., Liu, X. R., Gao, J. Z., Zhang, J. W., Ning, Z. Q., and Lu, X. P. (2017)

- CS2164, a novel multi-target inhibitor against tumor angiogenesis, mitosis and chronic inflammation with anti-tumor potency, *Cancer Sci.*, **108**, 469-477, doi: 10.1111/CAS.13141.
62. Falchook, G. S., Bastida, C. C., and Kurzrock, R. (2015) Aurora kinase inhibitors in oncology clinical trials: current state of the progress, *Semin. Oncol.*, **42**, 832-848, doi: 10.1053/J.SEMINONCOL.2015.09.022.
 63. Boss, D. S., Witteveen, P. O., van der Sar, J., Lolkema, M. P., Voest, E. E., Stockman, P. K., Ataman, O., Wilson, D., Das, S., and Schellens, J. H. (2011) Clinical evaluation of AZD1152, an i.v. inhibitor of Aurora B kinase, in patients with solid malignant tumors, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, **22**, 431-437, doi: 10.1093/ANNONC/MDQ344.
 64. Schwartz, G. K., Carvajal, R. D., Midgley, R., Rodig, S. J., Stockman, P. K., Ataman, O., Wilson, D., Das, S., Shapiro, G. I. (2013) Phase I study of barasertib (AZD1152), a selective inhibitor of Aurora B kinase, in patients with advanced solid tumors, *Invest. New Drugs*, **31**, 370-380, doi: 10.1007/S10637-012-9825-7.
 65. Löwenberg, B., Muus, P., Ossenkuppele, G., Rousselot, P., Cahn, J. Y., Ifrah, N., Martinelli, G., Amadori, S., Berman, E., Sonneveld, P., Jongen-Lavrencic, M., Rigaudeau, S., Stockman, P., Goudie, A., Faderl, S., Jabbour, E., and Kantarjian, H. (2011) Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia, *Blood*, **118**, 6030-6036, doi: 10.1182/BLOOD-2011-07-366930.
 66. Tsuboi, K., Yokozawa, T., Sakura, T., Watanabe, T., Fujisawa, S., Yamauchi, T., Uike, N., Ando, K., Kihara, R., Tobinai, K., Asou, H., Hotta, T., and Miyawaki, S. (2011) A Phase I study to assess the safety, pharmacokinetics and efficacy of barasertib (AZD1152), an Aurora B kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced acute myeloid leukemia, *Leuk. Res.*, **35**, 1384-1389, doi: 10.1016/J.LEUKRES.2011.04.008.
 67. Kantarjian, H. M., Martinelli, G., Jabbour, E. J., Quintás-Cardama, A., Ando, K., Bay, J. O., Wei, A., Gröpper, S., Papayannidis, C., Owen, K., Pike, L., Schmitt, N., Stockman, P. K., and Giagounidis, A. (2013) Stage I of a phase 2 study assessing the efficacy, safety, and tolerability of barasertib (AZD1152) versus low-dose cytosine arabinoside in elderly patients with acute myeloid leukemia, *Cancer*, **119**, 2611-2619, doi: 10.1002/CNCR.28113.
 68. Dennis, M., Davies, M., Oliver, S., D'Souza, R., Pike, L., and Stockman, P. (2012) Phase I study of the Aurora B kinase inhibitor barasertib (AZD1152) to assess the pharmacokinetics, metabolism and excretion in patients with acute myeloid leukemia, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **70**, 461-469, doi: 10.1007/S00280-012-1939-2.
 69. McNeish, I., Anthoney, A., Loadman, P., Berney, D., Joel, S., Halford, S. E. R., Buxton, E., Race, A., Ikram, M., Scarsbrook, A., Patikis, A., Rockall, A., Dobbs, N. A., and Twelves, C. (2013) A phase I pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of the selective aurora kinase inhibitor GSK1070916A, *J. Clin. Oncol.*, **31**, 2525-2525, doi: 10.1200/JCO.2013.31.15_SUPPL.2525.
 70. Borthakur, G., Dombret, H., Schafhausen, P., Brummendorf, T. H., Boisse, N., Jabbour, E., Mariani, M., Capolongo, L., Carpinelli, P., Davite, C., Kantarjian, H., and Cortes, J. E. (2015) A phase I study of danusertib (PHA-739358) in adult patients with accelerated or blastic phase chronic myeloid leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant or intolerant to imatinib and/or other second generation c-ABL therapy, *Haematologica*, **100**, 898-904, doi: 10.3324/HAEMATOL.2014.115279.
 71. Wu, X., Liu, W., Cao, Q., Chen, C., Chen, Z., Xu, Z., Li, W., Liu, F., and Yao, X. (2014) Inhibition of Aurora B by CCT137690 sensitizes colorectal cells to radiotherapy, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **33**, 13, doi: 10.1186/1756-9966-33-13.
 72. Tao, Y., Leteur, C., Calderaro, J., Girdler, F., Zhang, P., Frascogna, V., Varna, M., Opolon, P., Castedo, M., Bourhis, J., Kroemer, G., and Deutsch, E. (2009) The aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe, *Cell Cycle*, **8**, 3172-3181, doi: 10.4161/cc.8.19.9729.
 73. Sak, A., Stuschke, M., Groneberg, M., Kübler, D., Pöttgen, C., and Eberhardt, W. E. E. (2012) Inhibiting the aurora B kinase potently suppresses repopulation during fractionated irradiation of human lung cancer cell lines, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **84**, 492-499, doi: 10.1016/J.IJROBP.2011.12.021.
 74. Liu, N., Wang, Y. A., Sun, Y., Ecsedy, J., Sun, J., Li, X., and Wang, P. (2019) Inhibition of Aurora A enhances radiosensitivity in selected lung cancer cell lines, *Respir. Res.*, **20**, 230, doi: 10.1186/S12931-019-1194-8.

THE ROLE OF *AURORA B* KINASE IN NORMAL AND CANCER CELLS

Review

E. Titova^{1*}, G. Shagieva¹, V. Dugina^{1,2}, and P. Kopnin³

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: ekaterina.v.titova@gmail.com*

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

³ *Institute of Carcinogenesis, Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Public Health Ministry of Russian Federation, 115478 Moscow, Russia*

Aurora kinases are essential players in the process of mammalian cell division. Intracellular events in which Aurora kinases are involved include the regulation of spindle dynamics, microtubule-kinetochore interactions, chromosome condensation and orientation during mitosis. At least three members of the Aurora family – A, B and C – have been identified in mammals. Aurora B has been shown to be essential for maintaining genomic stability and normal cell division. Mutations and dysregulation of this kinase have been implicated in tumour initiation and progression. In this review, we discuss the functions of Aurora B, the relationship between increased Aurora B activity and carcinogenesis, and the prospects for the use of Aurora B kinase inhibitors in antitumour therapy.

Keywords: Aurora B, cell cycle, mitosis, cancer, Aurora B inhibitors

ТОПОЛОГИЯ ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ В ХРОМАТОСОМНОМ ОКРУЖЕНИИ УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ E3 RNF168

© 2023 А.А. Кудряева*, Л.А. Якубова, Г.А. Саратов, В.И. Владимиров,
В.М. Липкин, А.А. Белогуров

*Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: anna.kudriaeva@gmail.com*

Поступила в редакцию 03.05.2023

После доработки 19.07.2023

Принята к публикации 20.09.2023

Убиквитин-лигаза E3 RNF168 суперсемейства RING является важнейшим компонентом комплекса, осуществляющего убиквитинирование гистонов H2A/H2AX вблизи двуцепочечных разрывов ДНК, что является ключевой стадией привлечения факторов репарации к месту повреждения. В настоящей работе нами однозначно показано, что RNF168 не имеет природной способности непосредственно различать архитектуру полиубиквитиновых цепей, за исключением тропности двух её убиквитин-связывающих доменов UDM1/2 к убиквитинам, соединённым через аминокислотный остаток K63. Анализ внутриклеточного хроматосомного окружения полноразмерной RNF168 и её доменов методом лиганд-индуцированного резонансного переноса биолюминесценции выявил, что C-концевая часть UDM1 ассоциирована с K63-полиубиквитиновыми цепями; RING и N-концевая часть UDM2 стерически сближены с K63- и K48-убиквитиновыми цепями, в то время как C-концевая часть UDM1 локализована со всеми возможными вариантами убиквитина. Полученные результаты совместно с имеющимися структурными данными позволяют выдвинуть гипотезу, что C-концевая часть UDM1 связывает K63-полиубиквитиновые цепи на линкерном гистоне H1; RING и N-концевая часть UDM2 находятся в центральной части нуклеосомы и сближены с H1 и K48-убиквитинированными альтернативными субстратами RNF168, возможно, деметилазами JMJD2A/B, в то время как C-концевая часть UDM1, вероятно, находится в области активированного остатка убиквитина, связанного с убиквитин-лигазой E2 в составе комплекса с RNF168. Резюмируя, наши данные могут объяснить наличие большого количества протяжённых неструктурированных участков в RNF168, которые потенциально необходимы этой E3-лигазе для корректного позиционирования доменов UDM1/2 с целью многоточечного взаимодействия со множеством партнёров в её динамическом хроматосомном окружении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убиквитин, убиквитиновые цепи, убиквитин-лигаза, гистоны, репарация ДНК, двуцепочечные разрывы ДНК, посттрансляционные модификации, NanoBRET.

DOI: 10.31857/S0320972523120084, **EDN:** NKVSRR

ВВЕДЕНИЕ

В каждой клетке высокоорганизованных многоклеточных организмов ежесекундно происходят десятки событий, повреждающих ДНК. Отсутствие репарации этих повреждений может привести к геномной нестабильности и злокачественной трансформации [1, 2]. Двуцепочечные разрывы ДНК (DSB) являются одними из наиболее опасных повреждений, поскольку их неправильная репарация может привести к

фрагментации хромосом и неминуемой гибели клеток [3]. Существует два основных пути восстановления DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация (HR). Независимо от пути репарации, хроматин, окружающий место разрыва, должен быть ремоделирован, чтобы обеспечить доступ для белков репарации ДНК [4]. Ремоделирование хроматина играет важную роль в функционировании всех клеточных процессов с участием ДНК, включая транскрипцию, репли-

Принятые сокращения: ППР – поверхностный плазмонный резонанс; DSB – двуцепочечные разрывы ДНК; HR – гомологичная рекомбинация; LR – мотив, содержащий дипептид лейцин-аргинин; NanoBRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии с использованием люциферазы NanoLuc; NHEJ – негомологичное соединение концов.

* Адресат для корреспонденции.

кацию ДНК и репарацию ДНК, и состоит в согласованной передаче сигналов, обусловленной посттрансляционными модификациями гистонов, такими как фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и убиквитинирование [5, 6].

Убиквитинирование – ковалентное присоединение убиквитина к субстратам – осуществляется при помощи системы, состоящей из трёх ферментов: E1 (убиквитин-активирующий фермент), E2 (убиквитин-конъюгирующий фермент) и убиквитин-лигазы E3. ε-Аминогруппы семи аминокислотных остатков лизина (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), входящих в состав убиквитина, позволяют ему образовывать изопептидные связи [7, 8]. Как правило, первый убиквитин присоединяется к остатку лизина, входящему в состав субстрата, с помощью C-концевого остатка глицина (G76). Дальнейший рост цепи обусловлен образованием изопептидных связей между внутренними остатками лизинов уже встроенного убиквитина и C-концевым остатком глицина нового убиквитина. Также возможно образование цепи через остаток M1 убиквитина. Параметры цепей крайне разнообразны: они могут быть как гомогенными, то есть образовывать связи через остатки лизинов в строго определённом положении, так и гетерогенными – комбинировать разные типы связей. Последние, в свою очередь, могут разветвляться посредством убиквитинирования сразу по нескольким сайтам. Считается, что значение сигнала убиквитинирования зависит от типа связи и длины убиквитиновой цепи [9]. Удаление этих сигналов осуществляется с помощью деубиквитирующих ферментов (DUB). Функциональные роли убиквитиновых цепей, образованных через остатки лизина K48 и K63, достаточно хорошо изучены. K48-Убиквитинирование считается сигналом протеасомной деградации, тогда как K63-убиквитинирование обеспечивает белок-белковые взаимодействия в различных процессах, в том числе при репарации ДНК [10, 11]. Помимо важности K11 и M1 убиквитиновых связей в регуляции клеточного цикла и активации NF-κB [12, 13], мало что известно об убиквитин-лигазах, рецепторах убиквитина и функциях других неканонических цепей убиквитина (K6, K27, K29, K33).

Одной из основных функций убиквитинирования в репарации DSB является поддержание баланса между NHEJ и HR. Моноубиквитинирование гистонов H2A и H2AX по аминокислотным остаткам K13/K15 убиквитин-лигазой RNF168 содействует привле-

чению белка 53BP1, который способствует дальнейшей репарации DSB по пути NHEJ, в то время как опосредованное комплексом белков BRCA1–BARD1 моноубиквитинирование H2A по K125/K127 или K129 способствует замещению 53BP1 на BRCA1 и последующей резекции концов ДНК, что является первым этапом HR [14]. Поскольку все процессы требуют тонкой временной и пространственной настройки, множество убиквитин-лигаз и DUB задействовано в передаче сигналов о повреждении ДНК для обеспечения эффективной и точной репарации DSB [15].

Убиквитин-лигаза E3 RNF168 – белок с ядерной локализацией длиной 571 а.о., является одним из основных участников в передаче сигнала при DDR (DNA damage response). Уровень RNF168 строго контролируется белками TRIP12 и UBR5, чтобы предотвратить чрезмерное усиление сигнала убиквитинирования [16]. Считается, что RNF168 способствует сборке K27-, K48- и K63-цепей, а также моноубиквитинированию [14, 17, 18]. Функциональные домены RNF168 достаточно подробно охарактеризованы: в N-концевой части располагается домен RING, ответственный за убиквитин-лигазную активность; в середине располагается домен UDM1 (Ub-dependent DSB recruitment module) и в C-концевой части – UDM2 (рис. 1). Считается, что домены UDM1 и UDM2 отвечают за распознавание убиквитиновых цепей, в первую очередь на гистонах вблизи двуцепочечных разрывов ДНК, и таким образом способствуют привлечению RNF168 к месту повреждения [6]. Функциональные домены RNF168 весьма консервативны среди позвоночных, гомология составляет от 35 до 95% [19].

На настоящий момент имеются довольно противоречивые данные о структуре убиквитиновых цепей, способных распознаваться полноразмерной RNF168 и ее функциональными доменами. В состав домена UDM1 входят три мотива: LRM1 (мотив LR, содержащий дипептид лейцин-аргинин), UMI (Ub-interacting motif [UIM] and MIU-related UBD) и MIU1 (motif interacting with Ub). UDM2 содержит UAD (ubiquitin-associated domain), MIU2 и мотив LRM2 (рис. 1). Считается, что убиквитин-лигаза E3 RNF168 распознает убиквитинированные белки с помощью трёх различных убиквитин-связывающих мотивов: MIU1, MIU2 и UMI. Мотив UMI домена UDM1 предпочтительно связывается с K63 убиквитиновыми цепями. В то же время мутация мотива MIU1 резко снижает связывание RNF168 с K48-цепями убиквитина [20]. Другое иссле-

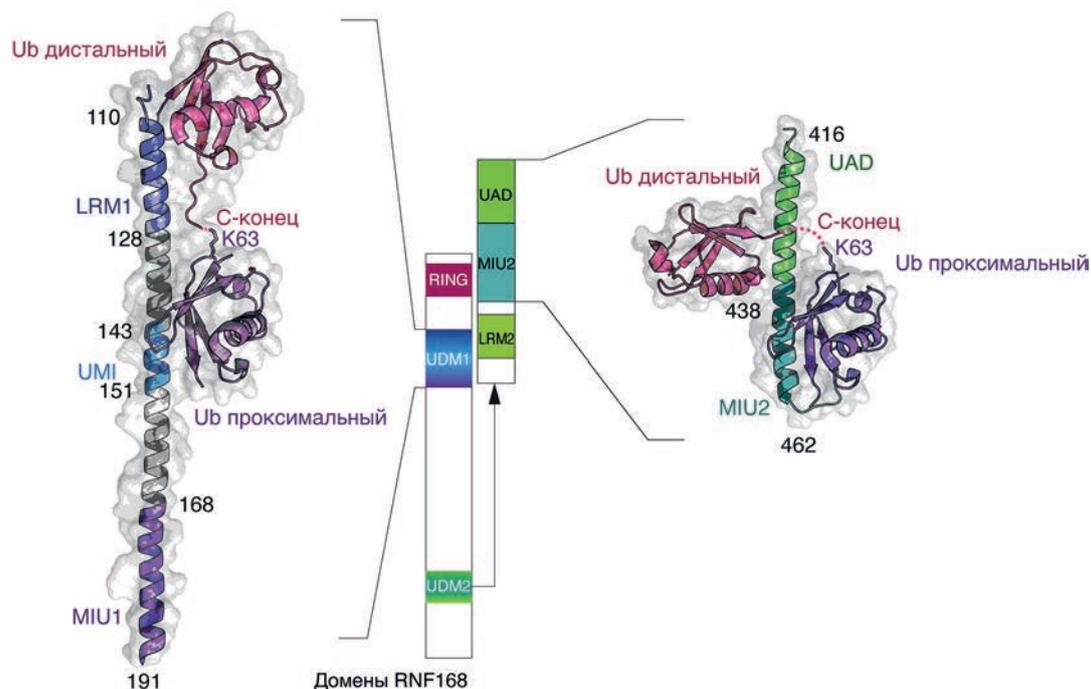


Рис. 1. Структурная организация и функциональные домены убиквитин-лигазы E3 RNF168

дование показало, что мотив MIU1 сам по себе проявляет сходную аффинность связывания с моноубиквитином, K48- и K63-цепями убиквитина [21]. Есть предположение, что более высокой аффинности связывания UMI с K63-цепями, по сравнению с MIU2, способствует мотив LRM1, несмотря на то что информация о способности его взаимодействия с убиквитиновыми цепями отсутствует [21]. Считается, что консервативный мотив LR необходим для привлечения лигаз RNF168 и RNF169 к убиквитинированному H2A и, возможно, способен связываться с H2A напрямую [22]. Интересно, что делеция мотива LRM2 домена UDM2, наоборот, способствует повышению сродства данного домена к K63 убиквитиновым цепям [21]. В настоящее время считается, что UDM1 и UDM2 взаимодействуют с различными K63-убиквитинированными мишенями: домен UDM1 способен распознавать убиквитинированные мишени, модифицированные убиквитин-лигазой RNF8, тогда как домен UDM2 распознает RNF168-опосредованные убиквитинированные мишени [19]. Функциональное различие между UDM1 и UDM2 может быть связано как с разными MIU-мотивами входящих в состав UDM, так и с консервативными LR-мотивами в их составе (LRM1 – в UDM1 и LRM2 – в UDM2) [21]. Есть данные, что полноразмерный белок RNF168 способен связываться K27-диубиквитином [17], однако в другой ра-

боте данная информация не была подтверждена [21].

Имеющиеся на настоящий момент литературные данные по характеру взаимодействия RNF168 и убиквитиновых цепей ограничены экспериментами *in vitro* или с использованием клеточных лизатов [20, 21, 23, 24]. В большинстве случаев в анализе используется ограниченный набор вариантов убиквитина. Более того, анализ делетированных доменов и изолированных небольших фрагментов RNF168 может иметь лишь отдалённое сходство с физиологическими процессами в клетке. В данной работе нами проведён исчерпывающий анализ параметров внутриклеточного связывания убиквитиновых цепей различного типа ветвления с убиквитин-лигазой RNF168 и её функциональными доменами с помощью метода лиганд-индуцированного резонансного переноса биолюминесценции с использованием люциферазы NanoLuc (NanoBRET).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение плазмид. Генетические конструкции, кодирующие функциональные домены убиквитин-лигазы RNF168 RING (1–110 а.о.), UDM1 (110–188 а.о.) и UDM2 (419–487 а.о.), слитные с Fc-доменом антитела IgG, а также содержащие лидерный пептид, направляющий синтезируемый белок во внеклеточную

среду для наработки белков в клетках млекопитающих HEK293F, были получены на основе вектора pFUSE (по сайтам рестрикции *EcoRI* и *NheI*). Генетические конструкции, кодирующие полноразмерную убиквитин-лигазу RNF168 и её функциональные домены RING, UDM1 и UDM2, слитные с белком HaloTag, и варианты убиквитина K0R K6/11/27/29/33/48/63, слитные с люциферазой NanoLuc и содержащие в своём составе единственный функциональный остаток лизина (для использования в методе NanoBRET), были получены на основе вектора pcDNA3 (по сайтам рестрикции *HindIII* и *XhoI*). Последовательности RNF168 RING (1–110 а.о.), UDM1 (110–188 а.о.) и UDM2 (419–487 а.о.) и полноразмерной RNF168 были амплифицированы с кДНК, полученной из клеток HEK293T. Последовательности NanoLuc и HaloTag были амплифицированы с плазмид pENTR4-HaloTag (Addgene, #29644) и pcDNA3.1 NL (Addgene; #113442) соответственно.

Культивирование клеток млекопитающих.

Клетки почки эмбриона человека HEK293T (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия) выращивали во флаконах для культивирования в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone, Cytiva», США) и смеси антибиотиков (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, гентамицин – 50 мкг/мл) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Клетки HEK293F выращивали в колбах при постоянном перемешивании в среде Freestyle («Thermo Fisher Scientific», США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Экспрессия RNF168 и её функциональных доменов в клетках млекопитающих HEK293F. Полученными плазмидами трансфицировали линию клеток HEK293F с использованием реагента PEI MAX («Polysciences, Inc.», США) и культивировали 96 ч. Очистку белков проводили с помощью магнитных частиц с иммобилизованным на них белком G («Thermo Fisher Scientific»).

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

На оптическом чипе CM5 («Cytiva», США) с применением протокола NHS-EDC иммобилизовали диубиквитины, связанные через различные аминокислотные остатки лизина – K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 («UbiQ», Нидерланды). Производили инъекцию серии образцов белка-аналита (домены убиквитин-лигазы RNF168) в возрастающей концентрации (1–15 мкМ) на скорости 10 мкл/мин. После регистрации диссоциации межмолекулярных

комплексов поверхность чипа обрабатывали регенерирующим раствором (10 мМ Gly-HCl, pH 2,5) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Анализ выполняли с использованием SPR-биосенсора Biacore 8K («Cytiva»). Для определения динамических констант диссоциации (K_d) диаграммы ППР анализировали, применяя модель адсорбции Ленгмюра (одна молекула аналита взаимодействует с одной молекулой лиганда). Данные сенсограмм взаимодействий обрабатывали в программном комплексе Biacore Insight Evaluation Version 3.0.11.15423.

Иммуноблоттинг. Проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях (градиентный гель 4–20%) по Лэммли с использованием предокрашенного белкового маркера («Bio-Rad», США). Далее проводили перенос на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad») в течение 1 ч при силе тока 0,8 мА/см². По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% сухого молока в PBS, и инкубировали 1 ч. Гибридизацию с антителами anti-Flag-HRP («Sigma», США) или anti-Strep-HRP («Bio-Rad») проводили в конъюгатном буфере в течение 1 ч. Далее, после тщательной отмывки наносили проявляющий раствор Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad») и проявляли на ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»).

NanoBRET. Для проведения анализа методом NanoBRET использовали набор NanoBRET Nano-Glo («Promega», США), в соответствии с инструкциями производителя. Клетки HEK293T при плотности $\sim 3 \times 10^5$ клеток на лунку котрансфицировали 200 нг плазмид NanoLuc-UbK0 K6/11/27/29/33/48/63 и HaloTag-RNF168/RING/UDM1/2 или RNF168/RING/UDM1/2-HaloTag или интактный HaloTag в соотношении 1 : 100 с использованием реагента трансфекции GenJect-39 («Molecta», Россия) в белых 96-луночных планшетах («Greiner», Германия). Через 24 ч после трансфекции к клеткам добавляли лиганд HaloTag NanoBRET 618 до конечной концентрации 100 нМ в среде DMEM Fluorobrite («Thermo Fisher Scientific»). Еще через 16 ч сигнал NanoBRET измеряли через 5 мин после добавления субстрата NanoLuc фуримазина в концентрации 10 мкМ с использованием микропланшетного ридера Tecan Spark Cyto 600 («Tecan», Германия) при 450/480 нм ВР (люминесценция донора) и 610 нм LP (флуоресценция акцептора). Соотношения NanoBRET рассчитывали как частное 610 нм LP (испускание)/(450/480 нм ВР (испускание) \times 1000. Скорректированное соотношение NanoBRET

получали путём вычитания сигнала контроля, не содержащего акцепторного лиганда, а затем дополнительно проводили нормировку на сигнал NanoBRET в присутствии интактного HaloTag.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Домены RNF168 обладают ограниченной способностью распознавать диубиквитины различной топологии *in vitro*. Рекомбинантные домены UDM1/2 и RING, слитные с константным фрагментом антитела человека, были получены в клетках млекопитающих HEK293F. Анализ взаимодействия очищенных функциональных доменов RNF168 (рис. 2, *a*) методом ППР, представленный на рис. 2, *б*, свидетельствует об отсутствии значимого уровня их связывания с диубиквитином с различным типом изоцептидной связи за исключением домена UDM1 и диубиквитина, связанного через аминокислотный остаток K63 ($K_d \sim 25$ мкМ) (рис. 2, *в*). Данное наблюдение коррелирует с имеющимися литературными данными [20], где было продемонстрировано связывание diUb63 с транскрипированным вариантом домена UDM1 – LRM1-UM1, слитным с GST ($K_d \sim 45$ мкМ). Полученные сенсограммы однозначно свидетельствуют о низкой аффинности ($K_d \gg 100$ мкМ) всех остальных проанализированных пар, в том числе к диубиквитинам, образованным через аминокислотные остатки K27 и K48.

Хроматосомное окружение E3-лигазы RNF168, выявленное методом лиганд-индуцированного резонансного переноса биолюминесценции. Относительно недавно была разработана новая система анализа внутриклеточных взаимодействий на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии – BRET-пара NanoLuc (460 нм) и HaloTag (618 нм) с расстоянием между пиками эмиссии и поглощения в 175 нм [25], названная авторами NanoBRET. Такой разрыв в максимумах свечения дает высокую чувствительность и низкий фоновый сигнал. Кроме того, данная система позволяет анализировать мультисубъединичные комплексы и взаимодействие крупных белков благодаря относительно большому для таких систем Фёрстеровскому радиусу, равному 6,97 нм, а экспериментально установленные рабочие дистанции находятся в диапазоне 3–10 нм [26]. В этой связи нами были созданы генетические конструкции, кодирующие варианты убиквитина только с одним функциональным остатком лизина (так называемые UbK0 с одной воз-

вратной заменой R→K), слитные на N-конце с люциферазой NanoLuc. Модифицированный таким образом убиквитин имеет аналогичные способности образовывать полиубиквитиновые цепи по сравнению с убиквитином, фланкированным N-концевым FLAG-эпитопом (рис. 3, *a*). Дополнительно были созданы генетические конструкции, кодирующие полноразмерную RNF168, а также её функциональные домены UDM1/2 и RING, слитные либо с N-, либо с C-конца с белком HaloTag и содержащие Strep-эпитоп (рис. 3, *б*).

Наличие резонансного переноса биолюминесценции в случае коэкспрессии соответствующих пар означает стерическую сближенность определённых доменов RNF168 и полиубиквитиновых цепей определённого типа ветвления (рис. 3, *в*). Анализ уровня внутриклеточной флуоресценции котрансфицированных клеток (рис. 3, *г* и *д*) выявил повышенную ассоциацию N-концевой части домена UDM1 с K63-убиквитиновыми цепям. Полноразмерная лигаза RNF168, слитная с HaloTag с N-конца, а также RING-домен продемонстрировали преимущественную сближенность с убиквитиновыми цепями, образованными через аминокислотные остатки K63 и K48. Анализ эффективности NanoBRET показал, что C-концевая часть домена UDM1 взаимодействует со всеми возможными убиквитиновыми цепями с некоторой повышенной тропностью к K48- и K63-цепям. N-Концевая часть UDM2-домена также имела повышенное сродство к полиубиквитиновым цепям, образованным через аминокислотные остатки K63 и K48, и менее выраженное – к K33-убиквитиновым цепям. C-Концевые части домена UDM2 и полноразмерной RNF168 не показали какого-либо достоверного сродства к убиквитиновым цепям. В случае UDM2-HaloTag это, возможно, связано с низким уровнем экспрессии данного слитного белка, выявленного по результатам иммуноблоттинга (рис. 3, *б*). Дополнительным фактором отсутствия сигнала может быть наличие слитного белка именно на C-конце UDM2, радикально влияющего на функционал этого домена RNF168, как это было нами показано в случае *in vitro* анализа (рис. 2, *б*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полноразмерный домен UDM1 (LRM-UM1-MIU1) показал достоверное сродство к K63-убиквитиновым цепям в *in vitro* системе ($K_d \sim 25$ мкМ), в отличие от домена UDM2 (UAD-MIU2-LRM2), для полноразмерного

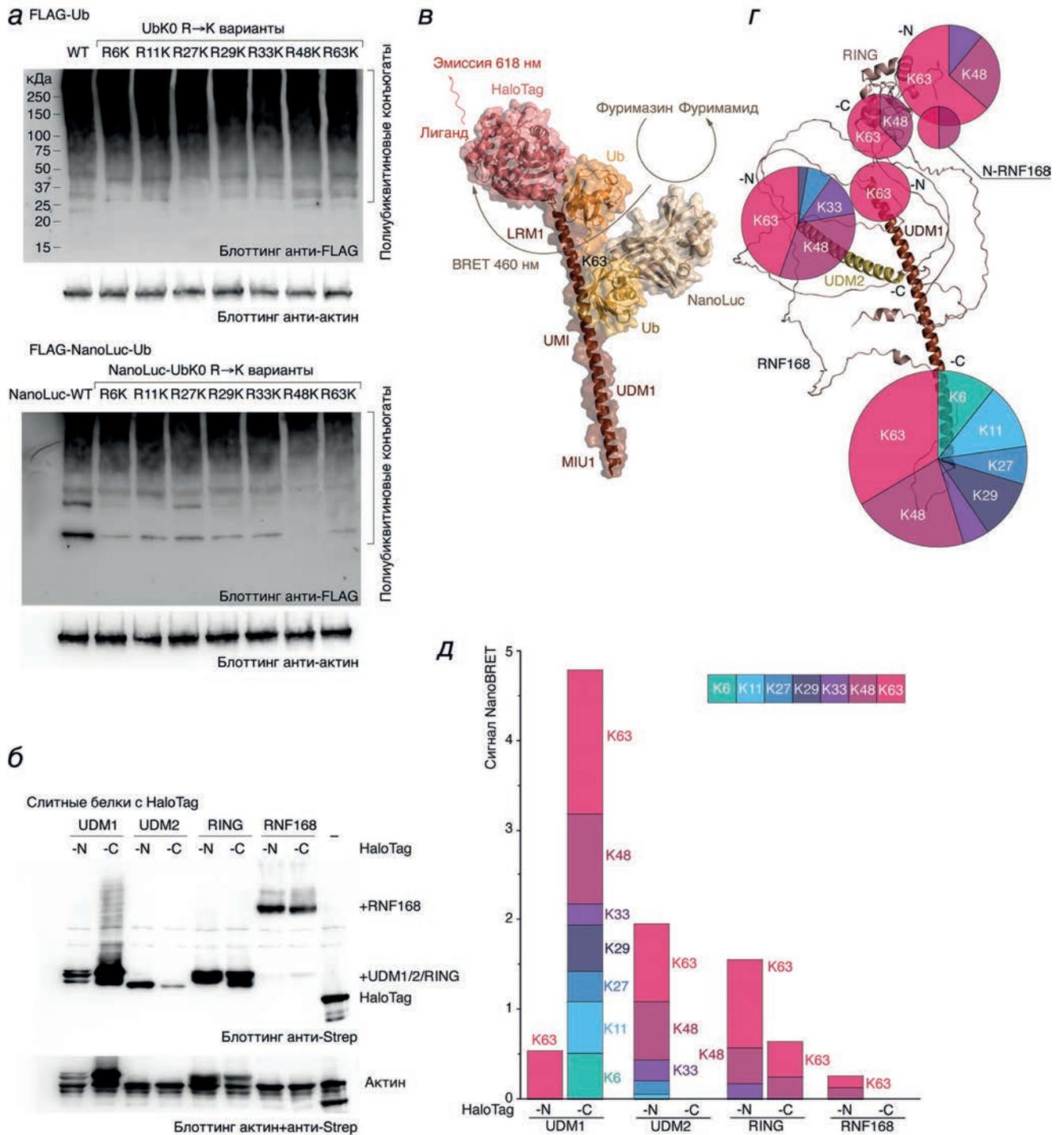


Рис. 3. Анализ убиквитинового окружения убиквитин-лигазы E3 RNF168 методом NanoBRET. *а* – Блоттинг лизатов клеток HEK293, трансфицированных кДНК, кодирующей FLAG-Ub и варианты FLAG-UbK0 R→K 6/11/27/29/33/48/63, а также NanoLuc-Ub и варианты NanoLuc-UbK0 R→K 6/11/27/29/33/48/63, с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина. *б* – Блоттинг клеток HEK293, трансфицированных кДНК, кодирующей полную RNF168, а также её функциональные домены UDM1/2 и RING, слитные либо с N-, либо с C-конца с белком HaloTag. *в* – Схематическое представление принципа анализа убиквитинового окружения убиквитин-лигазы RNF168 методом NanoBRET. Используются структуры домена UDM1 с K63 diUb (PDB 5XIS), люциферазы nLuc (PDB 7SNS) и белка HaloTag, связанного с лигандом тетраметилпроламином (PDB 6U32). *г* и *д* – Диаграмма сближенности убиквитиновых цепей различной топологии с функциональными доменами убиквитин-лигазы RNF168 (предположительная структура на основе предсказания нейросети AlphaFold; идентификатор AF-Q8IYW5-F1), построенной по результатам NanoBRET. Площадь круга на панели (*г*) соответствует сумме всех сигналов NanoBRET (высоте столбика) на панели (*д*). Значения сигнала NanoBRET на панели (*д*) нормализовано на сигнал белка HaloTag без доменов RNF168, коэкспрессированного с соответствующим вариантом убиквитина

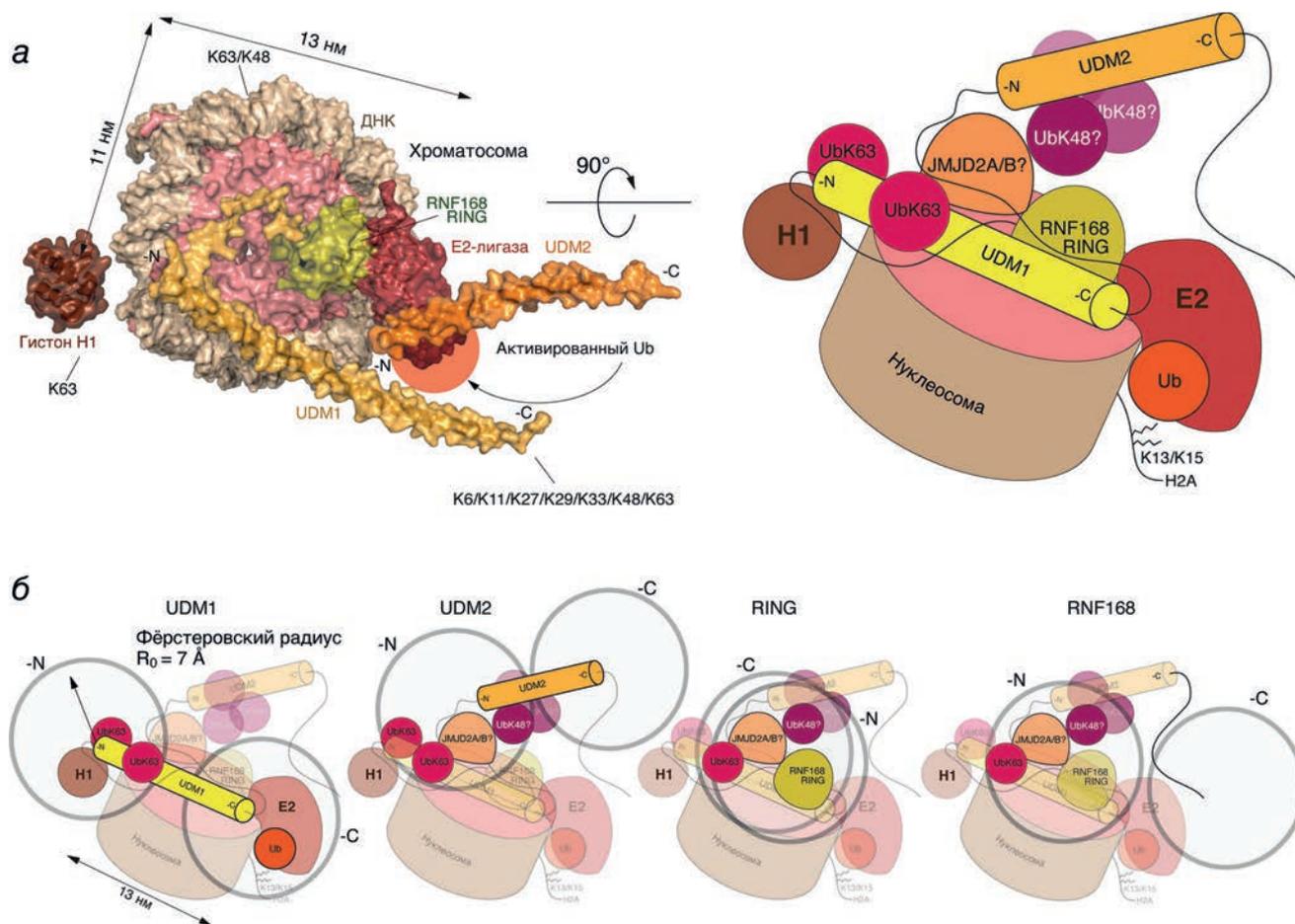


Рис. 4. Предположительная конфигурация убиквитинового окружения лигазы RNF168 в контексте хроматосомы. *a* – Левая модель выполнена на основе предложенной структуры комплекса RING-домена убиквитин-лигазы RNF168 (оливковый) с нуклеосомой (розовый и серый) и убиквитин-лигазой UbcH5c (красный) (PDBDEV_00000029, [24]). В структуру дополнительно добавлены домены UDM1 (желтый) и UDM2 (золотой) лигазы RNF168, а также глобулярный домен гистона H1B из структуры 5NL0 [27]. Указаны положения активированного убиквитина (тёмно-оранжевый) и зоны локализации вариантов убиквитинов по результатам NanoBRET. Правая модель схематически дополнена полиубиквитиновыми цепями, а также деметилазой JMJD2A/B. *б* – Возможные конформации расположения полноразмерной RNF168, а также её функциональных доменов UDM1/2 и RING, слитных либо с *N*-, либо с *C*-конца с белком HaloTag в контексте хроматосомы с учетом Фёрстеровского радиуса сигнала NanoBRET

сценарий взаимодействия белков, что улучшает понимание многих биологических процессов. Данный метод также может использоваться для *ex vivo* скрининга потенциальных лекарственных препаратов, которые могут влиять на белок-белковые взаимодействия. В целом, на настоящий момент метод NanoBRET является одним из наиболее мощных инструментов для изучения белковых взаимодействий в живых клетках. В этой связи мы решили использовать метод NanoBRET для изучения внутриклеточного убиквитинового окружения убиквитин-лигазы E3 RNF168. Полученные данные потенциально могли бы свидетельствовать о способности RNF168 распознавать те или иные цепи, а также о топологии окружающих её цепей. Учитывая линейные размеры нуклеосомы (рис. 4, *a*) [27] и рабочие расстоя-

ния системы NanoBRET (3–10 нм), можно говорить о том, что наблюдаемые нами сигналы являются достоверными.

На основании наших данных и предложенной на настоящий момент структуры комплекса нуклеосомы и RING-домена RNF168 [23], можно предположить, что UDM1-домен RNF168 располагается параллельно спиральям цепи ДНК вокруг нуклеосомы, пересекая её от одного полюса до другого (рис. 4, *a* и *б*).

N-Концевая часть домена UDM1 содержит мотивы LRM1 и UMI, в *C*-концевой части расположен мотив MIU1. Исходно считалось, что LRM1 распознает RNF8-опосредованно убиквитинированные белки [28]. Дальнейшие исследования показали, что LRM1 в UDM1 может взаимодействовать с линкерным гистонем H1 [29]. Вместе с тем показано,

что лигаза RNF169, содержащая данный мотив, с H1 не взаимодействует, что свидетельствует о неполном понимании функционала LRM1. Существуют данные, что домен UDM1 лигазы RNF168, содержащий как LRM1, так и UMI, проявляет более сильную аффинность к убиквитиновым цепям, образованным через остаток K63, чем только UMI [21]. Данное наблюдение указывает на то, что LRM1 может иметь вспомогательную роль при взаимодействии RNF168 с K63-цепями, это полностью согласуется с полученными нами данными о высокой специфичности *N*-концевой части UDM1 именно к K63-цепям, вероятно, расположенным на гистоне H1 [20] (рис. 4). *C*-Концевая часть UDM1, которая, по нашим данным, распознает все виды убиквитиновых цепей, скорее всего, расположена вблизи E2-лигазы, удерживаемой RNF168, которая физически переносит убиквитин на *N*-концевую часть H2A/H2AX (рис. 4). Вероятнее всего, сигнал NanoBRET, который мы фиксируем с конструкцией UDM1-HaloTag, – это тиоэфирный конъюгат любого из вариантов убиквити-на, слитного с NanoLuc, и E2.

N-Концевая часть домена UDM2, исходя из наших данных, более подвижна и может быть расположена как поблизости от *N*-концевой части RING, рядом с K63-убиквитиновым H1, так и находиться ортогонально и выше UDM1 вблизи K48-цепей, связанных с альтернативными субстратами RNF168. В случае *C*-концевой локализации HaloTag нам не удалось зафиксировать достоверного сигнала NanoBRET, что, возможно, связано с удалённостью *C*-концевой части UDM2 от убиквитиновых цепей. Также это наблюдение может быть объяснено низким уровнем экспрессии данного слитного белка или нарушением функционала UDM2 в целом вследствие наличия HaloTag на *C*-конце.

RING-домен, обуславливающий сближение субстрата и E2-лигазы, предположительно, расположен в центральной части нуклеосомы. Он напрямую взаимодействует с основным субстратом убиквитин-лигазы RNF168 – гистонем H2A [30], поэтому в относительной близости от RING могут находиться K63-убиквитиновые цепи, расположенные на гистонах H1 или H2A, либо, предположительно, K48-цепи на деметилазах JMJD2A и JMJD2B, которые также являются субстратами RNF168 [31].

Характер убиквитинового окружения *N*-концевой части полноразмерной RNF168 схож с RING-доменом (преимущественно K63-

и K48-содержащие полиубиквитиновые цепи), что соотносится с *N*-концевой позицией этого домена в структуре RNF168. *C*-Концевая часть, по-видимому, сильно удалена от убиквитиновых цепей, так как сигнал NanoBRET в этом случае отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода NanoBRET позволило впервые изучить внутриклеточное убиквитиновое окружение убиквитин-лигазы E3 RNF168, одного из ключевых участников репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Предполагается, что с гистонем H1, модифицированным K63-убиквитиновыми цепями, связывается *N*-концевая часть домена UDM1, в то время как его *C*-концевая часть находится диаметрально противоположно вблизи активированного остатка моноубиквитина, связанного тиоэфирной связью с убиквитин-лигазой E2, удерживаемой RNF168. RING-домен, как и *N*-концевая часть UDM2, находятся в центральной части нуклеосомы и, предположительно, стерически сближены с K48- и K63-убиквитиновыми цепями, находящимися на линкерном гистоне H1 и деметилазах JMJD2A/B. Полученные данные могут объяснить наличие большого количества протяжённых неструктурированных участков в RNF168, которые потенциально необходимы этой E3-лигазе для корректного позиционирования доменов UDM1/2 с возможностью многоочечного взаимодействия со множеством её хроматосомных партнёров и динамического переключения между ними.

Вклад авторов. А.А. Кудряева, А.А. Белогуров – концепция и руководство работой; А.А. Кудряева, Л.А. Якубова, Г.А. Саратов, В.И. Владимиров – проведение экспериментов; А.А. Кудряева, В.М. Липкин, А.А. Белогуров – обсуждение результатов исследования; А.А. Кудряева, А.А. Белогуров – написание текста; А.А. Кудряева, А.А. Белогуров – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-10154).

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. Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001) DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.*, **27**, 247-254, doi: 10.1038/85798.
2. Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, **461**, 1071-1078, doi: 10.1038/nature08467.
3. Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A. D. (2016) Repair pathway choices and consequences at the double-strand break, *Trends Cell Biol.*, **26**, 52-64, doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
4. Price, B. D., and D'Andrea, A. D. (2013) Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks, *Cell*, **152**, 1344-1354, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.011.
5. Kim, J. J., Lee, S. Y., and Miller, K. M. (2019) Preserving genome integrity and function: the DNA damage response and histone modifications, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **54**, 208-241, doi: 10.1080/10409238.2019.1620676.
6. Bacheva, A. V., Gotmanova, N. N., Belogurov, A. A., and Kudriaeva, A. A. (2021) Control of genome through variative nature of histone-modifying ubiquitin ligases, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, S71-S95, doi: 10.1134/S0006297921140066.
7. Ciechanover, A. (2015) The unravelling of the ubiquitin system, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **16**, 322-324, doi: 10.1038/nrm3982.
8. Kudriaeva, A. A., and Belogurov, A. A. (2019) Proteasome: a nanomachinery of creative destruction, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 159-192, doi: 10.1134/S0006297919140104.
9. Kudriaeva, A. A., Livneh, I., Baranov, M. S., Ziganshin, R. H., Tupikin, A. E., Zaitseva, S. O., Kabilov, M. R., Ciechanover, A., and Belogurov, A. A. Jr. (2021) In-depth characterization of ubiquitin turnover in mammalian cells by fluorescence tracking, *Cell. Chem. Biol.*, **28**, 1192-1205, doi: 10.1016/j.chembiol.2021.02.009.
10. Chen, Z. J., and Sun, L. J. (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling, *Mol. Cell*, **33**, 275-286, doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.014.
11. Jackson, S. P., and Durocher, D. (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO, *Mol. Cell*, **49**, 795-807, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.017.
12. Iwai, K., and Tokunaga, F. (2009) Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B activation, *EMBO Rep.*, **10**, 706-713, doi: 10.1038/embor.2009.144.
13. Matsumoto, M. L., Wickliffe, K. E., Dong, K. C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D. S., Hymowitz, S. G., Rape, M., Kelley, R. F., and Dixit, V. M. (2010) K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody, *Mol. Cell*, **39**, 477-484, doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.001.
14. Uckelmann, M., and Sixma, T. K. (2017) Histone ubiquitination in the DNA damage response, *DNA Repair (Amst)*, **56**, 92-101, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.06.011.
15. Nishi, R. (2017) Balancing act: To be, or not to be ubiquitylated, *Mutat. Res.*, **803-805**, 43-50, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.006.
16. Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Gröfte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Neumann, B., Heriche, J. K., Shearer, R., Saunders, D., Bartek, J., Lukas, J., and Lukas, C. (2012) TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes, *Cell*, **150**, 697-709, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.039.
17. Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M. G., Aebersold, R., and Penengo, L. (2015) RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage, *Cell Rep.*, **10**, 226-238, doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.021.
18. Kudriaeva, A. A., Lipkin, V. M., and Belogurov, A. A. (2020) Topological features of histone H2A monoubiquitination, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **493**, 193-197, doi: 10.1134/S1607672920040079.
19. Kelliher, J., Ghosal, G., and Leung, J. W. C. (2022) New answers to the old RIDDLE: RNF168 and the DNA damage response pathway, *FEBS J.*, **289**, 2467-2480, doi: 10.1111/febs.15857.
20. Pinato, S., Gatti, M., Scandiuzzi, C., Confalonieri, S., and Penengo, L. (2011) UMI, a novel RNF168 ubiquitin binding domain involved in the DNA damage signaling pathway, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 118-126, doi: 10.1128/mcb.00818-10.
21. Takahashi, T. S., Hirade, Y., Toma, A., Sato, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Tomito, A., Nakada, S., and Fukai, S. (2018) Structural insights into two distinct binding modules for Lys63-linked polyubiquitin chains in RNF168, *Nat. Commun.*, **9**, 170, doi: 10.1038/s41467-017-02345-y.
22. Kitevski-LeBlanc, J., Fradet-Turcotte, A., Kukic, P., Wilson, M. D., Portella, G., Yuwen, T., Panier, S., Duan, S., Canny, M. D., van Ingen, H., Arrowsmith, C. H., Rubinstein, J. L., Vendruscolo, M., Durocher, D., and Kay, L. E. (2017) The RNF168 paralog RNF169 defines a new class of ubiquitylated histone reader involved in the response to DNA damage, *Elife*, **6**, e23872, doi: 10.7554/eLife.23872.
23. Pinato, S., Scandiuzzi, C., Arnaudo, N., Citterio, E., Gaudino, G., and Penengo, L. (2009) RNF168, a new RING finger, MIU-containing protein that modifies chromatin by ubiquitination of histones H2A and H2AX, *BMC Mol. Biol.*, **10**, 55, doi: 10.1186/1471-2199-10-55.
24. Horn, V., Uckelmann, M., Zhang, H., Eerland, J., Aarsman, I., le Paige, U. B., Davidovich, C., Sixma, T. K.,

- and van Ingen, H. (2019) Structural basis of specific H2A K13/K15 ubiquitination by RNF168, *Nat. Commun.*, **10**, 1751, doi: 10.1038/s41467-019-09756-z.
25. Machleidt, T., Woodroffe, C. C., Schwinn, M. K., Méndez, J., Robers, M. B., Zimmerman, K., Otto, P., Daniels, D. L., Kirkland, T. A., and Wood, K. V (2015) NanoBRET – a novel BRET platform for the analysis of protein-protein interactions, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 1797-1804, doi: 10.1021/acschembio.5b00143.
 26. Weihs, F., Wang, J., Pflieger, K. D. G., and Dacres, H. (2020) Experimental determination of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) Förster distances of NanoBRET and red-shifted BRET pairs, *Anal. Chim. Acta X*, **6**, 100059, doi: 10.1016/j.acax.2020.100059.
 27. Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., Cutter, A. R., Papai, G., Reymer, A., Syed, S. H., Lone, I. N., Tonchev, O., Crucifix, C., Menoni, H., Papin, C., Skoufias, D. A., Kurumizaka, H., Lavery, R., Hamiche, A., Hayes, J. J., Schultz, P., Angelov, D., Petosa, C., and Dimitrov, S. (2017) Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1, *Mol. Cell*, **66**, 384-397.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.012.
 28. Panier, S., Ichijima, Y., Fradet-Turcotte, A., Leung, C. C. Y., Kaustov, L., Arrowsmith, C. H., and Durocher, D. (2012) Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks, *Mol. Cell*, **47**, 383-395, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.045.
 29. Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T. K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2015) Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage, *Nature* **527**, 389-393, doi: 10.1038/nature15401.
 30. Mattioli, F., Uckelmann, M., Sahtoe, D. D., van Dijk, W. J., and Sixma, T. K. (2014) The nucleosome acidic patch plays a critical role in RNF168-dependent ubiquitination of histone H2A, *Nat. Commun.*, **5**, 3291, doi: 10.1038/ncomms4291.
 31. Mallette, F. A., and Richard, S. (2012) K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites, *Cell Res.*, **22**, 1221-1223, doi: 10.1038/cr.2012.58.

TOPOLOGY OF UBIQUITIN CHAINS IN THE E3 UBIQUITIN LIGASE RNF168 CHROMATOSOME ENTOURAGE

**A. A. Kudriaeva*, L. A. Yakubova, G. A. Saratov, V. I. Vladimirov,
V. M. Lipkin, and A. A. Belogurov, Jr.**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: anna.kudriaeva@gmail.com*

Genome stability is critical for normal functioning of cells and depends on accuracy of DNA replication, chromosome segregation, and DNA repair. Cellular defense mechanisms against DNA damage are important for preventing the development of cancer and aging. The E3 ubiquitin ligase RNF168 of the RING superfamily is an essential component of the complex responsible for the ubiquitination of H2A/H2A.X histones near DNA double-strand breaks, which is a key step in attracting repair factors to the injury site. In this study, we unequivocally showed that RNF168 does not have ability to directly distinguish the architecture of polyubiquitin chains, except for tropism of its two ubiquitin-binding domains UDM1/2 to K63 ubiquitin chains. Analysis of the intracellular chromatosomal environment of full-length RNF168 and its domains by ligand-induced bioluminescence resonance energy transfer (BRET) revealed that the C-terminal part of UDM1 is associated with K63 ubiquitin chains; RING and the N-terminal part of UDM2 are sterically close to K63- and K48- ubiquitin chains, while the C-terminal part of UDM1 is colocalized with all possible ubiquitin variants. Our observations together with the available structural data suggest that the C-terminal part of UDM1 binds K63 polyubiquitin chains on linker histone H1; RING and the N-terminal part of UDM2 are located in the central part of the nucleosome and sterically close to H1 and K48-ubiquitinated alternative substrates of RNF168, such as JMJD2A/B demethylases, while the C-terminal part of UDM1 is in the region of an activated ubiquitin residue associated with E2 ubiquitin ligase, engaged by RNF168.

Keywords: ubiquitin, ubiquitin chains, ubiquitin ligase, histones, DNA repair, double-strand breaks, post-translational modifications, NanoBRET

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ
НА АКТИВНОСТЬ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ФЕРМЕНТОВ
ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *Trypanosoma cruzi*
И L-ГАЛАКТОНО-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ИЗ *Arabidopsis thaliana* В СИСТЕМЕ ОБРАЩЁННЫХ МИЦЕЛЛ**

© 2023 А.А. Чудин, Е.В. Кудряшова*

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

Поступила в редакцию 22.05.2023

После доработки 02.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Исследование многих мембранных ферментов в водной среде затруднено, что обуславливает необходимость использования мембрано-подобных систем, таких как обращённые мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ). Однако мицеллы являются упрощённой моделью природных мембран, значительную часть которых составляют фосфолипиды. В работе изучено влияние фосфолипидов, фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на активность мембранных ферментов на примере галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). Исследовано влияние структуры мицеллообразующего ПАВ на активность ферментов на примере анионного ПАВ (АОТ), нейтрального ПАВ (Бридж-96) и смеси катионного и анионного ПАВ (ЦТАБ и АОТ). Обнаружено выраженное влияние липидных добавок ФХ и ФЭ на активность AtGALDH и TcGAL, проявляющееся в увеличении каталитической активности и значительном изменении профилей зависимости активности ферментов от размера мицелл (степени гидратации). Обнаруженные эффекты обусловлены снижением плотности отрицательного заряда мицеллярной матрицы, а также влиянием липидных добавок на олигомерный состав ферментов, что связано с формированием тетрамерной формы ферментов и/или белок-липидных комплексов. При варьировании состава и структуры мицеллообразующего ПАВ (АОТ, ЦТАБ и Бридж-96) изменение каталитических свойств ферментов обусловлено влиянием ПАВ на размер мицелл, подвижность липидов, заряд и жёсткость самой матрицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: смешанные мицеллы, катионные ПАВ, галактонолактондегидрогеназа, фосфолипиды, *Trypanosoma cruzi*, *Arabidopsis thaliana*.

DOI: 10.31857/S0320972523120096, **EDN:** NLBOGA

ВВЕДЕНИЕ

Мембранный фермент галактонолактоноксидаза из организма-паразита *Trypanosoma cruzi* (TcGAL), вызывающего болезнь Шагаса, ответственен за синтез витамина С *in vivo*, и его ингибирование можно рассматривать как потенциальное лечение болезни Шагаса, поскольку *T. cruzi* не способен усваивать витамин С извне, а организм человека не содер-

жит галактонолактонооксидазы. Трипаносомы содержат значительный уровень аскорбата (витамина С), который синтезируется в гликозомах, особых одномембранных органеллах, ассоциированных с митохондриями [1]. TcGAL в рассматриваемом процессе катализирует финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона (ГЛ) или D-арабиноно-1,4-лактона (АЛ) [2]. Геномный анализ показал, что биосинтез аскорбата в трипано-

Принятые сокращения: АЛ – D-арабиноно-1,4-лактон; АОТ – ди-2-этилгексилловый эфир сульфоянтарной кислоты, анионное ПАВ; ГЛ – L-галактоно-1,4-лактон; ДЛС – метод динамического рассеивания света; ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол; ПАВ – поверхностно-активные вещества; ФМС – феназинметосульфат; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид, катионное ПАВ; ЭА – электроноакцептор; AtGALDH – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*; TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*; W_0 – степень гидратации.

* Адресат для корреспонденции.

сомах аналогичен таковому в растениях [3, 4], где финальную стадию катализирует фермент L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH), гомологичный TcGAL. Однако изучение TcGAL, как и многих других мембранных ферментов, осложнено, поскольку для реализации их нативной конформации и проявления каталитической активности требуется наличие мембранной матрицы. В настоящий момент единственной разработанной системой, в которой удалось успешно провести сворачивание и измерить активность TcGAL, являются обращённые мицеллы анионного ПАВ (АОТ) в октане, предложенные нами ранее [1, 5]. Мы также продемонстрировали, что AtGALDH, гомологичная TcGAL и катализирующая ту же реакцию (синтез витамина C), может использоваться в модельной системе, позволяющей изучать функции фермента как в мицеллах АОТ, так и в водной среде [5]. AtGALDH – мембранотропный фермент, предположительно, локализуется в митохондриальном межмембранном пространстве, связанном с митохондриальным комплексом I, где фермент участвует в переносе электронов в электрон-транспортную цепь через цитохром *c* [6].

Отметим, что обращённые мицеллы АОТ являются релевантными моделями митохондриальных мембран. Известно, что мембраны митохондрий содержат небислоиные липидные структуры, представляющие собой ассоциаты молекул липидов, построенные по типу обращённых мицелл, заключённых между монослоями двухслойной мембраны [7]. Главным параметром обращённых мицелл является размер их внутренней полости, который можно регулировать, варьируя степень гидратации ($W_0 = [H_2O]/[ПАВ]$) [7]. Максимальная активность ферментов в мицеллах наблюдается при степени гидратации W_0 , обеспечивающей соответствие размера внутренней полости мицеллы и геометрических параметров солюбилизированного фермента. В случае олигомерных ферментов на зависимостях каталитической активности от W_0 наблюдаются несколько оптимумов, которые соответствуют функционированию отдельных олигомерных форм фермента, обладающих каталитической активностью [8].

Предложенный нами метод сворачивания TcGAL в мицеллах АОТ, представляющих собой модель биомембраны, является действенным подходом, позволяющим изучать каталитические свойства данного мембранного фермента [1, 5]. Мажорными фосфолипидами биомембран *T. cruzi* являются фосфатидилхоллин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) [9, 10],

составляющие 44 и 28% от общего количества фосфолипидов [11]. Изменение липидного состава существенно влияет на функционирование организма *T. cruzi*: так, показано, что подавление роста *T. cruzi* аджоеном, сероорганическим соединением-антиагрегантом, связано со специфическим изменением фосфолипидного состава клеток организма-паразита, что в том числе выражается в ингибировании биосинтеза ФХ и увеличении содержания ФЭ [12].

В данной работе мы исследуем влияние добавок ФХ и ФЭ на активность TcGAL в мицеллярной системе АОТ, которая является методически отработанной, позволяющей получать гомогенные оптически прозрачные микроэмульсии, и способной растворять все необходимые компоненты реакционной системы для измерения активности фермента. Отметим, что сами ФХ и ФЭ склонны формировать липосомы – оптически непрозрачную суспензию, что затрудняет проводить спектрофотометрическое определение активности TcGAL.

Помимо липидных компонентов, важную роль играет выбор мицелообразующего ПАВ. Наиболее широко используемым ПАВ является анионный АОТ, образующий мицеллы в широком диапазоне степеней гидратации и обладающий узким распределением мицелл по размеру. Кроме анионных ПАВ, в качестве мицеллярной матрицы находят применение нейтральные (Бридж-96) и катионные (ЦТАБ) ПАВ, а также смешанные мицеллы на основе этих ПАВ [7]. Так, использование смешанных мицелл на основе катионного ПАВ (ЦТАБ) и нейтрального (Бридж-92) позволяет увеличить активность пероксидазы хрена в 2 раза по сравнению с мицеллами на основе только ЦТАБ [13].

Важным представляется изучение и сравнение свойств водорастворимого и мембранных ферментов AtGALDH и TcGAL в системах обращённых мицелл – моделей биомембран – в зависимости от структуры и заряда мицеллообразующего ПАВ и наличия липидных добавок. Таким образом, целью данной работы является сравнительная характеристика каталитических свойств AtGALDH и TcGAL в зависимости от природы ПАВ и от характеристик липидных компонент в системах обращённых мицелл как моделей митохондриальных мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: L-галактоно-1,4-лактон,

D-арабиноно-1,4-лактон, 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), ди-2-этилгексиловой эфир сульфоянтарной кислоты, цетилтриметиламмоний бромид, Бридж-96, октан, компоненты буферных растворов, 1,2-диолеоил-*sn*-глицерофосфоэтаноламин (ФЭ), феназинметосульфат (ФМС) и фосфатидилхолин из яичных желтков («Sigma-Aldrich», США).

Рекомбинантная экспрессия AtGALDH и TcGAL и рефолдинг телец включения TcGAL. Рекомбинантную экспрессию AtGALDH (EC 1.3.2.3) и TcGAL (EC 1.3.3.12) в *Escherichia coli* проводили согласно методике, описанной ранее [1, 14]. AtGALDH-His6 экспрессировался в клетках *E. coli* BL21(DE3) в виде растворимого цитоплазматического белка. Для продукции фермента TcGAL использовали клетки *E. coli* BL21(DE3), несущие плазмиду pBAD-TcGAL (любезно предоставлена проф. W.J.H. van Berkel (Вагенингенский университет, Нидерланды)). TcGAL формировал нерастворимые тельца включения. Рефолдинг TcGAL проводили согласно методике, описанной нами ранее [1]. Суспензию телец включения, собранных после лизиса клеток, промывали 6%-ным раствором Triton X-100, содержащим 60 мМ ЭДТА и 1,5 М NaCl (pH 7,0) и растворяли в 6 М гуанидин хлориде. Затем гуанидин хлорид удаляли диализом против 10 мМ фосфата натрия (pH 8,0). После диализа суспензию агрегированного фермента вносили в систему обращённых мицелл вода-АОТ-октан, степени гидратации ($W_0 = 30$) достигали добавлением 10 мМ фосфата натрия (pH 8,0). Растворы окисленного и восстановленного глутатиона (100 мМ GSSG и 300 мМ GSH) в 10 мМ фосфате натрия (pH 8,0) смешивали, и аликвоту (10 мкл) добавляли к 1 мл мицеллярного раствора фермента в 0,4 М АОТ. Рефолдинг фермента инициировали добавлением 10 мкл раствора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к ферменту). Сворачивание и конечную концентрацию фермента в мицеллах контролировали методом КД-спектроскопии с использованием КД-спектрометра Jasco J-815 («JASCO», Япония).

Измерение ферментативной активности AtGALDH и TcGAL. Анализ активности AtGALDH в мицеллах при добавлении липидных добавок проводили в системе обращённых мицелл АОТ [4, 15]. Для измерения активности TcGAL в систему обращённых мицелл АОТ (содержащих субстрат, электроноакцептор (ЭА) и все требуемые компоненты системы, включая липидные добавки) добавляли аликвоту запасного раствора TcGAL в 0,4 М АОТ, в котором предварительно был проведён рефолдинг фер-

мента (1–2 мг/мл). Для спектрофотометрического определения активности ферментов использовалась комбинация 120 мкМ ФМС в качестве ЭА и 120 мкМ ДХФИФ (проявитель аскорбата). В качестве субстратов использовали ГЛ и АЛ в случае AtGALDH и TcGAL соответственно. Для исследования влияния липидных добавок на активность фермента в систему обращённых мицелл (0,1 АОТ в октане) добавляли 5% ФХ или ФЭ (% w/w по липидам, т.е. массовые проценты липида от общей массы ПАВ в системе). Для изучения влияния природы мицеллообразующего ПАВ на активность ферментов были выбраны мицеллы на основе анионного ПАВ (0,1 М АОТ в октане), нейтрального ПАВ (0,1 М Бридж-96 в циклогексане) и смешанные мицеллы, содержащие 0,1 М АОТ и 10% w/w ЦТАБ в октане.

Седиментационный анализ олигомерных форм AtGALDH. Седиментационный анализ проводили на аналитической ультрацентрифуге Beckman E («Beckman», США), снабжённой фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором, при скорости 40 000 об./мин аналогично методикам, описанным ранее [15, 16]. Для установления олигомерного состава AtGALDH были изучены мицеллярные растворы белка (0,1 мг/мл) при степенях гидратации $W_0 = 21$ и $W_0 = 32$, соответствующих функционированию мономерной и димерной форм. Сканирование мицелл, содержащих белок, проводили при длине волны 450 нм. Коэффициенты седиментации пустых мицелл определяли в независимых экспериментах при 405 нм с добавлением 2,4-динитрофенола для окрашивания мицелл. Коэффициенты седиментации рассчитывали с использованием программы SediFit из полученных экспериментальных кривых. Молекулярную массу AtGALDH рассчитывали по стандартной методике, описанной ранее [8, 15, 16], используя формулу:

$$M_p = M_0 \left(\frac{s_p}{s_0} - 1 \right) (1 - \rho V_0), \quad (1)$$

где M_0 – молекулярная масса мицелл без фермента (пустых), s_p и s_0 – коэффициенты седиментации фермент-содержащих и пустых мицелл соответственно, V_0 – парциальный молярный объём пустых мицелл в растворителе с плотностью ρ [16].

Метод динамического рассеивания света (ДРС). Измерения динамического рассеяния света проводились на оборудовании Zetasizer Nano S («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) с использованием гелий-неонового лазера (4 мВт) при длине волны 633 нм.

Анализ данных проведён с помощью программного обеспечения «Zetasizer Software». Вязкость диспергатора (октана) – 0,54 сП; показатель преломления диспергатора – 1,39; показатель преломления воды – 1,33. За размер частиц принимали среднее значение трёх независимых измерений.

Изучение взаимодействия фосфатидилхолина и AtGALDH методом ИК-спектроскопии. ИК-спектры регистрировали, используя ИК-Фурье-спектрометр Bruker Tensor 27 («Bruker», Германия) с термостатируемой ячейкой BioATR-II с элементом ZnSe ATR. ИК-спектры регистрировали в диапазоне 2000–1200 см⁻¹ со спектральным разрешением 1 см⁻¹.

Комплексообразование фосфатидилхолина с AtGALDH. Для оценки взаимодействия AtGALDH с ФХ определяли зависимость поляризации флуоресценции AtGALDH в присутствии различных концентраций ФХ, регистрируя интенсивность на флуоресцентном спектрометре Varian Cary Eclipse («Agilent Technologies», США) при длине волны возбуждения 450 нм и длине волны испускания 530 нм, характерных для FAD-содержащих систем [17]. Концентрацию AtGALDH поддерживали постоянной (2,5 мкМ), концентрацию ФХ варьировали в диапазоне 0–6 мМ в натрий-фосфатном буфере (рН 8,0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Профили каталитической активности AtGALDH и TcGAL в системе обращённых мицелл АОТ. Основным параметром системы об-

ращённых мицелл является размер внутренней полости, который можно строго регулировать, варьируя степень гидратации ($W_0 = [H_2O]/[ПАВ]$) [18]. В общем случае оптимум активности фермента наблюдается при степени гидратации, отвечающей соответствию внутренней полости мицеллы геометрическим параметрам солюбилизированного фермента [8]. Зависимости каталитической активности AtGALDH и TcGAL от степени гидратации в системе обращённых мицелл АОТ с использованием ФМС (120 мкМ) в качестве ЭА представлены на рис. 1.

Для обоих ферментов наблюдаются два оптимума активности ($W_0 = 22–24$) и ($W_0 = 26–28$), что, предположительно, соответствует функционированию мономерной и димерной форм ферментов. Для определения олигомерного состава AtGALDH в системах обращённых мицелл проведён седиментационный анализ олигомерных форм в зависимости от степени гидратации.

Олигомерный состав AtGALDH в системе обращённых мицелл АОТ. На рис. 2 представлены седиментограммы образцов AtGALDH-содержащих мицеллы при степенях гидратации $W_0 = 21$, где наблюдается первый оптимум активности, и при $W_0 = 32$, предположительно, в области существования димерной формы (где мономерная форма заведомо отсутствует).

На седиментограммах AtGALDH наблюдаются две выраженные ступени у каждой из кривых. Нижняя ступень (медленно осаждающиеся частицы) – ближе к мениску жидкости – соответствует «пустым» мицеллам.

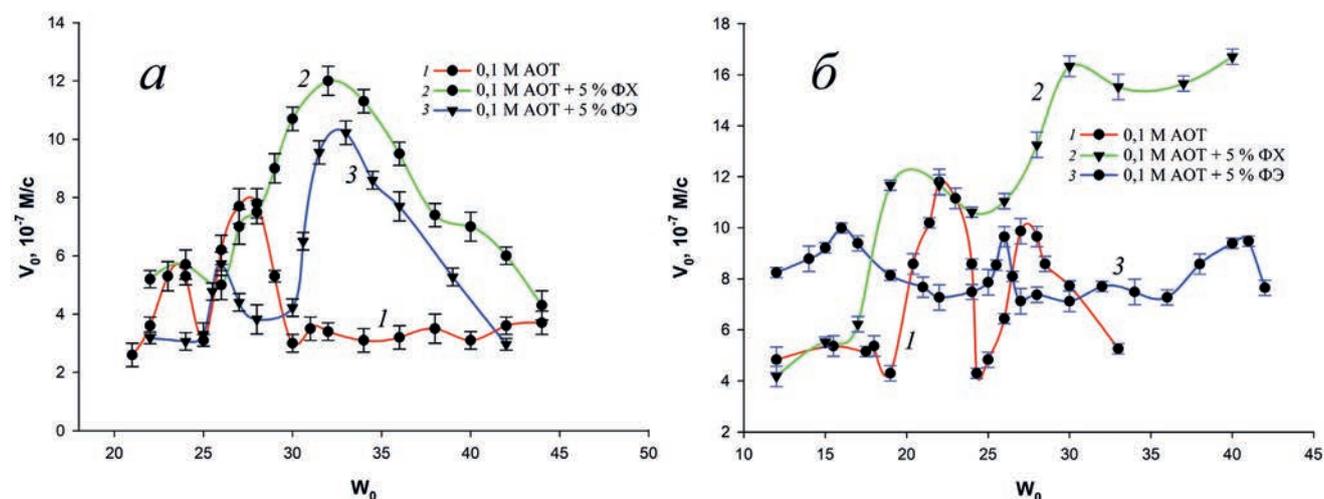


Рис. 1. Профили каталитической активности AtGALDH (а) и TcGAL (б) в системе обращённых мицелл 0,1 М АОТ в *n*-октане при отсутствии липидов, при добавлении 5% ФХ и при добавлении 5% ФЭ. Условия: 120 мкМ ФМС, 120 мкМ ДХФИФ, рН 8,8, $\lambda = 550$ нм, 25 °С. Концентрации: 6 нМ AtGALDH и 1 мМ ГЛ (а); 34 нМ TcGAL и 1 мМ АЛ (б). АЛ – D-арабиноно-1,4-лактон; ГЛ – L-галактоно-1,4-лактон

Таблица 1. Параметры AtGALDH-содержащих и пустых мицелл, рассчитанные по данным седиментационного анализа

W_0	s_p	s_0	$1-\rho V_0$	M_0 , кДа	M_p , кДа
21	29 ± 1	17 ± 1	$0,353 \pm 0,005$	251 ± 11	66 ± 5
34	46 ± 2	32 ± 1	$0,341 \pm 0,002$	739 ± 17	$111,3 \pm 9,0$

Примечание. Обозначения как для уравнения (1).

Верхняя ступень (быстро осаждающиеся частицы) – ближе ко дну кюветы – представляет собой мицеллы, содержащие белок. Каждая кривая записывалась в определённое время ($t_n > t_{n-1} > \dots > t_3 > t_2 > t_1$, где t_n соответствует красной кривой, а t_1 – синей кривой). Общая продолжительность измерений – 60 мин. Коэффициенты седиментации s_p и s_0 при степенях гидратации $W_0 = 21$ и 34 для фермент-содержащих и пустых мицелл определены согласно уравнению (1) [16]. С применением эмпирической формулы (1), исходя из значений коэффициентов седиментации s_p , определили молекулярную массу фермента M_p , для степени гидратации 21 и 34 (табл. 1).

Рассчитанная молекулярная масса фермента M_p при $W_0 = 34$ примерно в 2 раза превышает рассчитанное значение M_p при $W_0 = 21$. Это подтверждает предположение о том, что оптимумы на профиле каталитической активности соответствуют наличию в системе мономерной и димерной форм. Молекулярная масса фермента – 58,8 кДа, однако известно, что фермент имеет вытянутую вдоль одной из осей структуру [1], поэтому незначительное увеличение кажущейся массы при степени гидрата-

Таблица 2. Сравнение радиусов для AtGALDH и TcGAL

Форма белка	r_p^* , Å (AtGALDH)	r_p , (теор.) Å (TcGAL)**	r_p^* , Å (TcGAL)
Мономер	$38,5 \pm 0,3$	36,5	$37,5 \pm 0,2$
Димер	$44,5 \pm 0,2$	47	$45,0 \pm 0,3$

Примечание. * Рассчитаны с использованием уравнения (2). ** Литературные данные (радиусы TcGAL, рассчитанные согласно 3D-моделированию) [1].

ции, соответствующей мономеру, является закономерным. Таким образом, показано, что в мицеллярной системе AtGALDH может существовать в двух различных олигомерных формах (при $W_0 = 21$ –22 функционирует мономер, при $W_0 \geq 32$ – димер). Отметим, что в водной фазе фермент AtGALDH функционирует только в мономерной форме – как показано методом гельфильтрационной хроматографии [14].

Для подтверждения полученных данных седиментационного анализа мы рассчитали экспериментальные радиусы предполагаемой мономерной и димерной форм для AtGALDH и TcGAL, исходя из их профилей каталитической активности (рис. 1, а и б) по эмпирическому уравнению [19]:

$$r_p(\text{Å}) = r_m(\text{Å}) = 1,5 \times W_0 + 4, \quad (2)$$

где r_m – внутренний радиус мицелл, r_p – максимальный радиус белка (половина длины наибольшей оси белка). Рассчитанные нами, согласно уравнению (2), радиусы предполагаемых мономерной ($r_p = 38,5 \text{ Å}$) и димерной ($r_p = 44,5 \text{ Å}$) форм для AtGALDH близки по

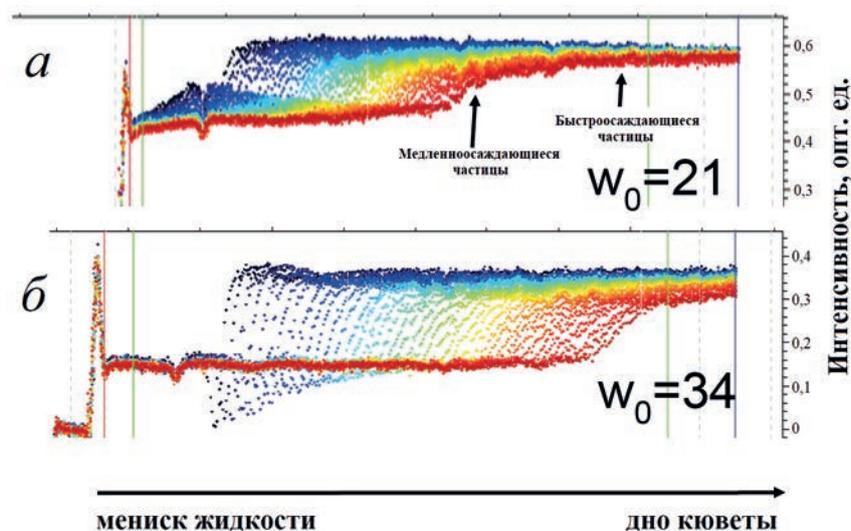


Рис 2. Экспериментальные седиментационные кривые для мицелл, содержащих AtGALDH, при степенях гидратации $W_0 = 21$ (а) и $W_0 = 34$ (б). Горизонтальная ось показывает расстояние между мениском жидкости и дном ячейки

значению к ранее найденным из 3D-моделирования для TcGAL [1] ($r_p = 36,5 \text{ \AA}$ и $r_p = 47 \text{ \AA}$ для мономера и димера соответственно) (табл. 2).

Полученные результаты подтверждают наше предположение о функционировании AtGALDH и TcGAL в мицеллах АОТ в виде двух олигомерных форм (мономерной и димерной) и согласуются с данными седиментационного анализа.

Влияние липидных добавок на активность AtGALDH и TcGAL. Основными липидными компонентами митохондриальных мембран *T. cruzi* являются фосфолипиды ФХ и ФЭ, вместе составляющие более 70% от общего количества фосфолипидов [10, 11]. ФХ характеризуется объёмной полярной «головной» группой и склонен к образованию ламеллярных структур. В то же время ФЭ склонен образовывать сферические обращённо-фазовые структуры (обращённые мицеллы) [9]. Степень кривизны в случае ФЭ меньше чем в мицеллах АОТ, поскольку у АОТ гидрофобная часть шире. Помимо геометрии молекул, ФХ и ФЭ различаются также по степени выраженности заряда аминокислотной группы: ФХ несёт положительный заряд холиновой группы (четвертичная аминокислота, в которой атомы водорода замещены на метильные группы), в то время как аминокислота ФЭ имеет $pK_a = 9,6$ и при слабощелочных рН 8,0 также положительно заряжена [20].

Включение фосфолипидов, несущих заряженные аминокислотные группы, в мицеллярную систему может играть существенную роль при взаимодействии мембранотропных ферментов с мицеллярной матрицей: например, в случае кислой фосфатазы добавление фосфолипидов, склонных снижать плотность отрицательного заряда и тем самым повышать локальный рН вблизи поверхности раздела фаз, снижает активность фермента [3]. Кроме того, заряд мицеллярной матрицы может влиять на стабилизацию той или иной формы кофактора в активном центре. Так, положительный заряд в области вблизи локуса N1-C2 изоаллоксазинового кольца флавина у AtGALDH [16] может стабилизировать анионную форму двухэлектронного восстановленного флавина.

В работе для исследования влияния ФХ и ФЭ на активность AtGALDH и TcGAL использовали системы 0,1 М АОТ, содержащие 5% ФХ или ФЭ (% w/w). Известно, что даже малые концентрации липидов (2%) могут усиливать или подавлять активность ферментов в несколько раз, как показано нами ранее на примере кислой фосфатазы в системах обращённых мицелл АОТ [9]. Обнаружено, что добавление каждого из липидов драматиче-

ски изменяет профиль зависимости каталитической активности AtGALDH от степени гидратации, по-разному влияя на активность фермента (рис. 1, а). Добавление ФХ приводит к увеличению уровня активности AtGALDH при всех степенях гидратации. Наблюдаемое возрастание активности может быть связано со снижением плотности отрицательного заряда АОТ на поверхности раздела фаз. Кроме того, включение ФХ в мицеллярную систему может способствовать лучшему взаимодействию фермента с поверхностью раздела фаз (меньше степень отталкивания фермента от отрицательной поверхности раздела фаз, образованной АОТ, и высокое сродство фермента с мембранным фосфолипидом ФХ). Помимо возрастания активности, включение в систему ФХ приводит к возникновению нового широкого оптимума при $W_0 = 30-34$, что может соответствовать функционированию AtGALDH в тетрамерной форме. На основании анализа ряда ферментов в литературе приводится корреляция между молекулярной массой фермента M_p и оптимальной степенью гидратации $W_{0, \text{опт}}$ в мицеллах АОТ, описываемая эмпирическим уравнением [19]:

$$W_{0, \text{опт}} = 0,5^3 \sqrt{M_p} - 2,7. \quad (3)$$

Исходя из этого уравнения, ожидаемая степень гидратации $W_{0, \text{опт}}$ для предполагаемого тетрамера AtGALDH с $M_p = 264 \text{ кДа}$ составляет 30 и более (30–34 – в нашем случае). С другой стороны, можно предположить, что оптимум активности AtGALDH при $W_0 = 30-34$ может быть обусловлен образованием липопротеидных комплексов различного состава, которые были обнаружены и для других мембранотропных ферментов (в т.ч. для кислой фосфатазы [9]). В пользу этого предположения говорит сильная размытость пика при $W_0 = 30-34$, в то время как для тетрамерной формы было бы характерно наличие более узкого оптимума, как, например, для тетрамеров лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы [21].

Добавление 5% ФЭ к AtGALDH оказывает похожее влияние на профиль активности, как и в случае ФХ: появляется пик при $W_0 = 30-33$, при этом пик, соответствующий мономерной форме, исчезает, что может быть связано с изменением структуры мицеллярной матрицы и изменением локального радиуса кривизны мицелл, что сказывается в основном при низких степенях гидратации.

Добавление липидных добавок оказывает существенное влияние и на мембранный

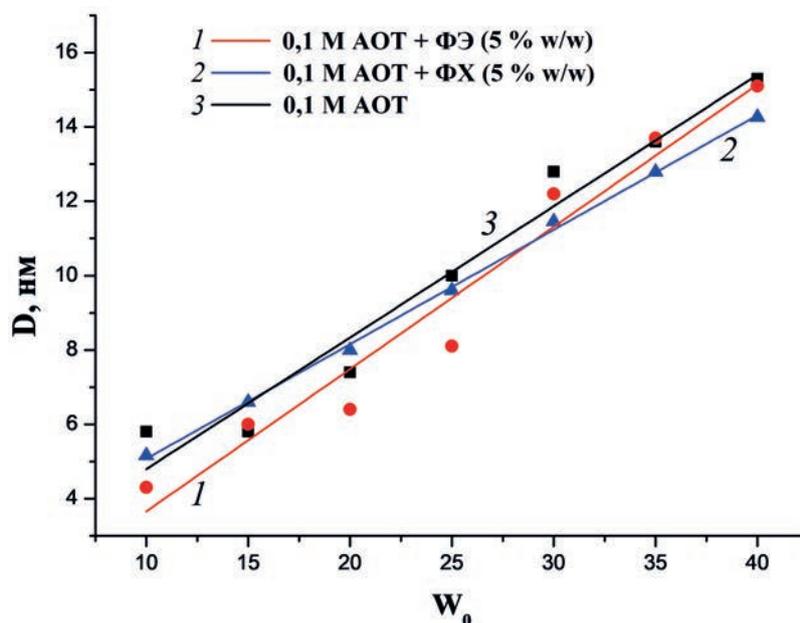


Рис. 3. Зависимости диаметра мицелл от степени гидратации по данным ДЛС. Мицеллы АОТ с добавлением ФЭ или ФХ (5% w/w) и мицеллы АОТ без липидных добавок – прямые (1), (2) и (3) соответственно

ТсGAL (рис. 1, б). Добавление 5% ФХ, как и в случае AtGALDH, приводит к увеличению уровня активности фермента в целом (по-видимому, за счёт снижения плотности отрицательного заряда мицеллярной матрицы), а также к появлению дополнительного «размытого» оптимума активности при $W_0 = 30–34$. Присутствие 5% ФЭ также значительно изменяет профиль каталитической активности ТсGAL по сравнению с исходными мицеллами АОТ: наблюдается сглаживание всего профиля зависимости активности от степени гидратации.

Учитывая сходство ТсGAL и AtGALDH, а именно: высокую гомологию (консервативность) активных центров ТсGAL и AtGALDH [5], общую катализируемую реакцию и общий ЭА, близкие размеры мономерной и димерной форм ферментов и сходство каталитических профилей в мицеллах АОТ, можно предположить, что оптимум активности при $W_0 = 30–34$ в случае ТсGAL, также как и в случае AtGALDH, соответствует функционированию тетрамерной структуры фермента и/или формированию липопротеидного комплекса.

Сравнивая влияние липидных добавок (ФХ и ФЭ) на водорастворимый AtGALDH и мембранный ТсGAL, следует отметить, что добавление ФХ приводит к увеличению активности обоих ферментов во всем интервале степеней гидратации. В то же время добавление ФЭ немного по-разному влияет на AtGALDH и ТсGAL. В случае AtGALDH наблюдается увеличение разницы между минимальным и мак-

симальным значениями активности (рис. 1, а) в присутствии ФЭ по сравнению с мицеллами АОТ. При этом в случае ТсGAL добавление ФЭ, скорее, нивелирует зависимость активности фермента от степени гидратации W_0 (рис. 1, б). По-видимому, структура мицелл, формирующаяся вокруг каждой из олигомерных форм фермента, в случае мицелл АОТ, содержащих ФЭ, более подвижная, чем в случае АОТ–ФХ, поэтому сглаживается различие между наиболее и наименее активными формами фермента. Сходный эффект «выравнивания» профиля каталитической активности наблюдался и в случае кислой фосфатазы в мицеллах АОТ, содержащих ФЭ (2 и 5%) [9].

Помимо влияния заряда и образования тетрамерной формы и/или белок-липидных комплексов, следует также учитывать возможное изменение размеров мицелл АОТ в присутствии ФХ или ФЭ. Например, в литературе отмечается, что 10%-ная добавка ФХ уменьшает радиус мицелл АОТ (примерно в 1,5 раза) [4]. Однако в нашем случае диаметры мицелл АОТ в присутствии 5% ФХ или 5% ФЭ (определённые методом ДЛС) не сильно изменены по отношению к исходной системе АОТ (рис. 3). Таким образом, в условиях данной работы изменение радиусов мицелл при добавлении липидов ФХ и ФЭ можно считать несущественным в плане влияния на активность AtGALDH и ТсGAL.

Изучение связывания AtGALDH с ФХ методом ИК-спектроскопии. Образование белок-липидного комплекса AtGALDH–ФХ было

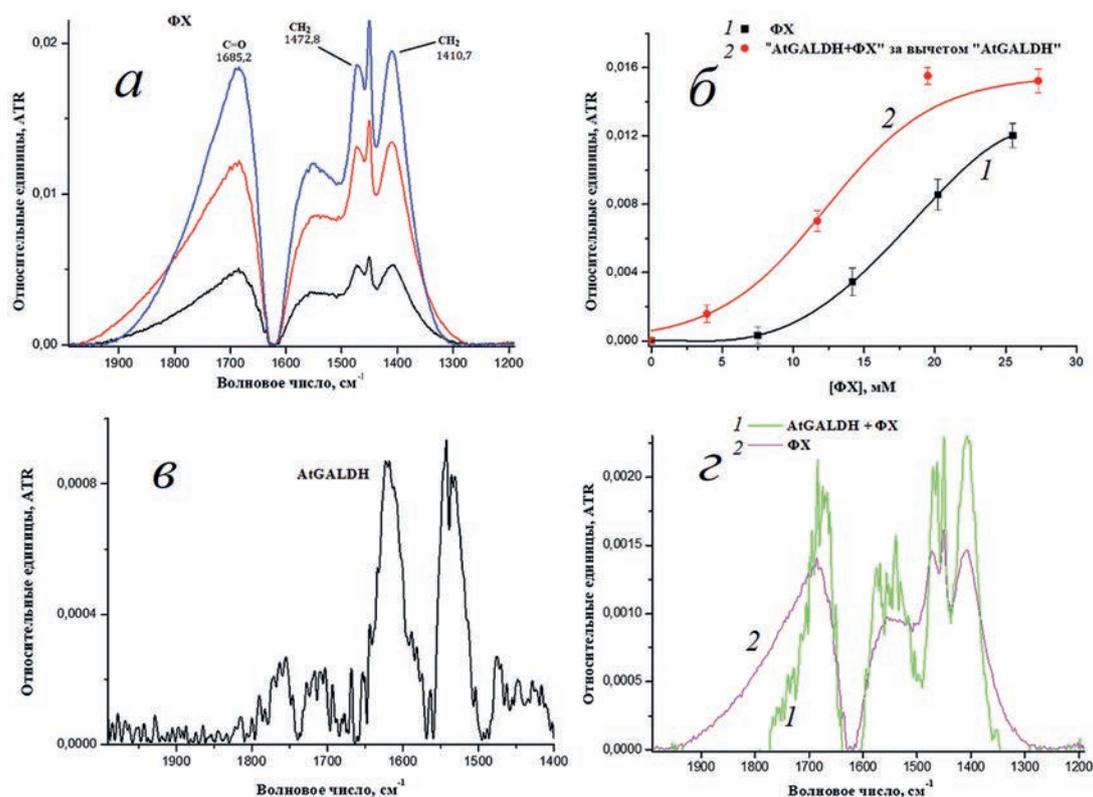


Рис. 4. ИК-спектры водных растворов 10–25 мМ ФХ (а). б – Поглощение при 1550 см^{-1} для водных растворов 0–25 мМ ФХ (кривая 1) и смеси 70 мкМ AtGALDH и 0–27 мМ ФХ за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 2). в – ИК-спектр 70 мкМ водного раствора AtGALDH. г – Сравнение спектра смеси AtGALDH (70 мкМ) и ФХ (4 мМ) за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 1) со спектром водного раствора ФХ (4 мМ, кривая 2).

изучено по влиянию фермента на ИК-спектр ФХ (рис. 4). В ИК-спектре ФХ наблюдаются аналитические пики, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) при 1685 см^{-1} и деформационным колебаниям CH_2 -группы при 1472 и 1411 см^{-1} . ИК-спектр фермента содержит классические полосы поглощения: амид 1 и амид 2 в интервалах $1500\text{--}1600$ и $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, характерные для белков [22]. В присутствии фермента форма ИК-спектра ФХ значительно отличается от спектра исходного ФХ, что указывает на связывание AtGALDH с ФХ. Наибольшие различия в спектрах ФХ и комплекса AtGALDH–ФХ наблюдаются в области карбонильной группы при 1680 см^{-1} и при 1550 см^{-1} (двойные связи остатков жирных кислот) (рис. 4, г). Эти различия обусловлены тем, что $\text{C}=\text{O}$ и CH_2 -группы жирнокислотных остатков в ФХ меняют своё микроокружение в присутствии фермента, что указывает на связывание фермента на поверхности раздела фаз липид (ФХ)–вода. На рис. 4, б представлена зависимость интенсивности пиков при 1550 см^{-1} от концентрации ФХ для свободного фосфолипида и ФХ в присутствии AtGALDH (за вычетом фонового спектра AtGALDH). Разный ход кривых ука-

зывает на образование комплекса AtGALDH–ФХ: при отсутствии взаимодействия между AtGALDH и ФХ ожидалось бы совпадение кривых (рис. 4, г).

Изучение связывания AtGALDH с ФХ методом поляризации флуоресценции. Метод поляризации флуоресценции, применяемый для количественной оценки реакций ассоциации белков с лигандами [23], основан на увеличении поляризации флуорофора при его связывании с другими молекулами за счёт снижения скорости вращения флуорофора. В настоящей работе метод был использован для изучения связывания AtGALDH с ФХ путём слежения за флуоресценцией FAD, кофактора фермента, в качестве флуорофора. Наблюдаемое тушение флуоресценции FAD-кофактора, а также увеличение поляризации AtGALDH при возрастании концентрации ФХ (рис. 5, а и б) свидетельствуют об образовании комплекса AtGALDH–ФХ. Аналогичное возрастание поляризации флуоресценции описано в литературе для связывания аполипопротеина A1 с ФХ [24].

Полученную зависимость поляризации флуоресценции от концентрации ФХ (рис. 5, б) обрабатывали в двойных логарифмических координатах (линейная форма эмпирическо-

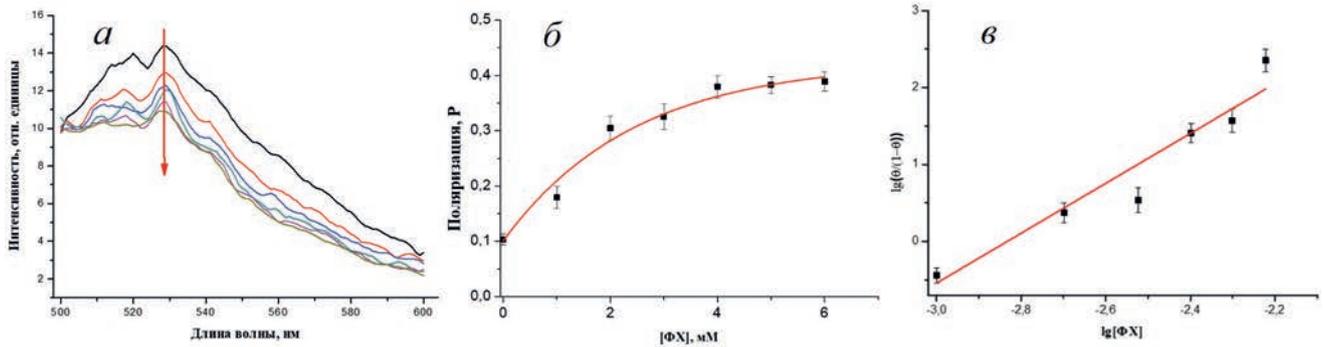


Рис. 5. Спектры флуоресценции смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и ФХ ($\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$), стрелкой показано увеличение концентрации ФХ от 0 до 6 мМ (а); поляризация флуоресценции Р смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и ФХ (1–6 мМ) ($\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$, $\lambda(\text{эмис.}) = 530 \text{ нм}$) (б); обработка данных по поляризации флуоресценции в координатах Хилла (в). Условия: PBS (рН 8,8); 2,4 мкМ AtGALDH; 1–6 мМ ФХ; T = 25 °С

го уравнения Хилла (4)) (рис. 5, в), широко используемых для обработки экспериментальных данных по связыванию лигандов с биологическими объектами (ферментами, рецепторами и др.) [25].

$$\lg\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n * \lg[\text{ФХ}] - n * \lg K_{0,5}, \quad (4)$$

где $\theta = (P_{\text{образца}} - P_{\text{min}})/(P_{\text{max}} - P_{\text{min}})$.

Определённый из графиков на рис. 5 эмпирический параметр $K_{0,5}$, коррелирующий с константой диссоциации, оценивается как 2 мМ, а наименьшее число центров связывания $n = 3$. Таким образом, данные, полученные методом поляризации флуоресценции, говорят

об эффекте комплексообразования фермента с ФХ, что объясняет появление размытых оптимумов (при $W_0 > 30$) в случае добавления ФХ и ФЭ в профилях каталитической активности AtGALDH и TcGAL.

Влияние мицеллообразующего ПАВ на активность TcGAL и AtGALDH. Активность мембранотропных ферментов в системах обращённых мицелл существенно зависит от природы ПАВ – нейтральной, катионной или анионной, и структурных особенностей формирующихся мицелл. Также имеет значение наличие относительно широкой области существования мицелл на фазовых диаграммах: в случае узкой области изучать фермент можно

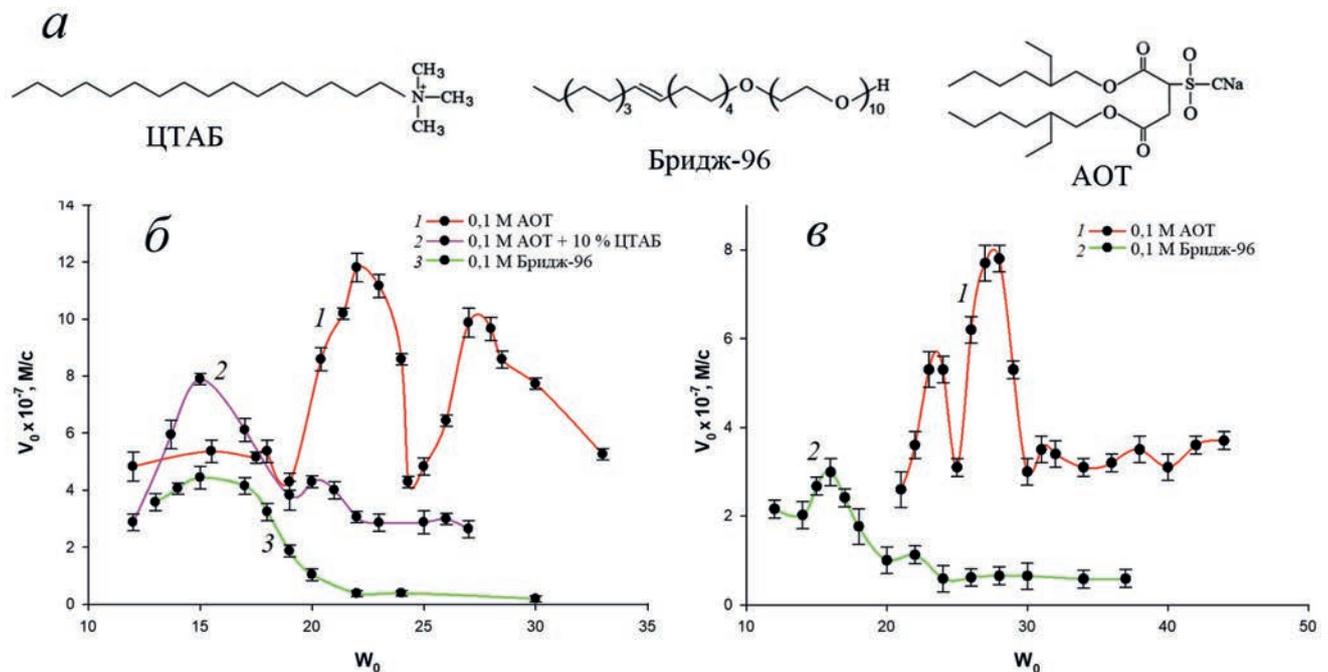


Рис. 6. Влияние природы мицеллообразующего ПАВ (а) на активность TcGAL (б) и AtGALDH (в) в системах обращённых мицелл. Условия общие для (б) и (в): 120 мкМ ФМС; 120 мкМ ДХФИФ; рН 8,8; $\lambda = 550 \text{ нм}$; 25 °С. Концентрации фермента и субстрата: $6 \times 10^{-9} \text{ М}$ AtGALDH и 1 мМ ГЛ (б) и 34 нМ TcGAL и 1 мМ АЛ (в) соответственно. АЛ – D-арабиноно-1,4-лактон; ГЛ – L-галактоно-1,4-лактон

лишь в ограниченном интервале значений степени гидратации W_0 [26].

В представленной работе изучено функционирование TcGAL и AtGALDH в мицеллах на основе нейтрального и катионного ПАВ на примере Бридж-96 и ЦТАБ. В случае как TcGAL, так и AtGALDH (рис. 6) при использовании нейтрального ПАВ Бридж-96 или смешанных мицелл, содержащих ЦТАБ, в профилях активности обоих ферментов наблюдается один основной пик при низких степенях гидратации ($W_0 < 20$), то есть регистрируется функционирование только мономерной формы. Отметим, что стабильные фермент-содержащие мицеллы на основе Бридж-96 формируются при низких степенях гидратации ($W_0 < 20$), при более высоких W_0 наблюдается фазовое расслоение системы [27].

Усиление ферментативной активности в ЦТАБ-содержащих мицеллах наблюдалось ранее и для других ферментов – тирозиназы и холестеролоксидазы, в случае которых в диапазоне $W_0 = 10–20$ использование мицелл на основе ЦТАБ обеспечивало большую активность фермента по сравнению с мицеллами АОТ [28, 29]. Активация мономерной формы TcGAL при $W_0 = 15$ (в случае ЦТАБ-содержащих мицелл), вероятно, как и в случае ФХ и ФЭ, обусловлена положительным зарядом ЦТАБ («разбавляющим» отрицательный заряд поверхности раздела фаз у АОТ). Следует отметить, что разница во влиянии ЦТАБ и липидов ФХ и ФЭ обусловлена склонностью к образованию различных надмолекулярных структур этих ПАВ: в силу геометрических характеристик ЦТАБ (объёмная полярная голова и узкий гидрофобный «хвост»; рис. 6, а) склонен к образованию прямых мицелл, в то время как ФХ и ФЭ имеют тенденцию к образованию ламеллярной структуры и обращённых мицелл соответственно. Таким образом, изменение активности фермента в присутствии ЦТАБ объясняется влиянием ЦТАБ на структуру обращённых мицелл АОТ: локальным изменением радиуса кривизны и формированием дефектов в мицеллярной матрице (существенно в большей степени, чем в случае ФХ и ФЭ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные говорят о существенном влиянии липидной матрицы на функционирование мембранотропных ферментов TcGAL и AtGALDH. Установлено, что в присутствии фосфолипидных добавок (ФХ и ФЭ)

в мицеллярных системах происходит усиление каталитической активности обоих ферментов за счёт изменения плотности заряда мицеллярной матрицы и изменения олигомерной структуры и радиуса кривизны мицелл. Наблюдается формирование новых олигомерных форм ферментов (тетрамеров), формирование липопротеидных комплексов, реализация более оптимальной конформации ферментов и т.д. Обнаружено, что активность TcGAL и AtGALDH сильно зависит от природы мицеллообразующего ПАВ: смешанные мицеллы на основе анионного и катионного ПАВ (АОТ + ЦТАБ) повышают активность фермента при $W_0 = 15$, однако при более высоких значениях W_0 наблюдается снижение каталитической активности. Различие во влиянии ЦТАБ и липидов обусловлено склонностью ЦТАБ в силу геометрии молекулы к образованию прямых мицелл (у ФХ и ФЭ – ламеллярная структура и обращённые мицеллы), что нарушает структуру обращённых мицелл АОТ и локально изменяет радиус кривизны мицелл. Полученные результаты открывают пути к регуляции каталитических свойств мембранных ферментов посредством варьирования состава липидной матрицы. Продемонстрирована возможность использования обращённых мицелл комбинированного состава для измерения активности TcGAL и AtGALDH в условиях, близких к функционированию ферментов при их взаимодействии с биомембранами. Включение липидных добавок позволит более достоверно оценивать действие возможных ингибиторов на TcGAL, являющегося потенциальной лекарственной мишенью в случае болезни Шагаса [30].

Вклад авторов. Е.В. Кудряшова – концепция и руководство работой; А.А. Чудин – проведение экспериментов; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин – обсуждение результатов исследования; А.А. Чудин – написание текста; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин – редактирование текста статьи.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометр Фурье Bruker Tensor 27 (Германия) и КД-спектрометр Jasco J-815 («JASCO», Япония)) по программе развития МГУ.

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. Kudryashova, E. V., Leferink, N. G. H., Slot, I. G. M., and Van Berkel, W. J. H. (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C, *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 545-552, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.03.001.
2. Quiñones, W., Acosta, H., Gonçalves, C. S., Motta, M. C. M., Gualdrón-López, M., and Michels, P. A. M. (2020) Structure, properties, and function of glycosomes in *Trypanosoma cruzi*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 25, doi: 10.3389/fcimb.2020.00025.
3. Wilkinson, S. R., Prathalingam, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., and Kelly, J. M. (2005) Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11645-11650, doi: 10.1073/pnas.0504251102.
4. Logan, F. J., Taylor, M. C., Wilkinson, S. R., Kaur, H., and Kelly, J. M. (2007) The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase, *Biochem. J.*, **407**, 419-426, doi: 10.1042/BJ20070766.
5. Chudin, A. A., and Kudryashova, E. V. (2022) Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL, using a reversed micellar system, *Analytica*, **3**, 36-53, doi: 10.3390/analytica3010004.
6. Leferink, N. G. H., Heuts, D. P. H. M., Fraaije, M. W., and van Berkel, W. J. H. (2008) The growing VAO flavoprotein family, *Arch. Biochem. Biophys.*, **474**, 292-301, doi: 10.1016/j.abb.2008.01.027.
7. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко И. Л., Мартинек К. (1984) Микрогетерогенная среда для химических (ферментативных) реакций на основе коллоидного раствора воды в органическом растворителе, *Успехи химии*, **53**, 545-565.
8. Klyachko, N. L., Shchedrina, V. A., Efimov, A. V., Kazakov, S. V., Gazaryan, I. G., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2005) pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16106-16114, doi: 10.1074/jbc.M414285200.
9. Kudryashova, E. V., Bronza, V. L., Vinogradov, A. A., Kamyshny, A., Magdassi, S., and Levashov, A. V. (2011) Regulation of acid phosphatase in reverse micellar system by lipids additives: structural aspects, *J. Colloid Interface Sci.*, **353**, 490-497, doi: 10.1016/j.jcis.2010.09.072.
10. De Azevedo-Martins, A. C., Ocaña, K., de Souza, W., de Vasconcelos, A. T. R., Teixeira, M. M. G., Camargo, E. P., Alves, J. M. P., and Motta, M. C. M. (2022) The importance of glycerophospholipid production to the mutualist symbiosis of trypanosomatids, *Pathogens*, **11**, 41, doi: 10.3390/pathogens11010041.
11. Oliveira, M. M., Timm, S. L., and Costa, S. C. G. (1977) Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*, *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.*, **58**, 195-199, doi: 10.1016/0305-0491(77)90109-2.
12. Urbina, J. A., Marchan, E., Lazard, K., Visbal, G., Aritz-Castro, R., Gil, F., Aguirre, T., Piras, M. M., and Piras, R. (1993) Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 2381-2387, doi: 10.1016/0006-2952(93)90217-k.
13. Shome, A., Roy, S., and Kumar, P. (2007) Nonionic surfactants: a key to enhance the enzyme activity at cationic reverse micellar interface, *Langmuir*, **23**, 4130-4136, doi: 10.1021/la062804j.
14. Leferink, N. G. H., van den Berg, W. A. M., and van Berkel, W. J. H. (2008) L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis, *FEBS J.*, **275**, 713-726, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x.
15. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко И. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. (1982) Ферменты, включенные в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях. Исследование системы белок-аэрозоль ОТ-Н₂O-октан методом седиментационного анализа, *Биохимия*, **47**, 86-99.
16. Levashov, A. V., Khmelnsky, Y. L., Klyachko, N. L., Chernyak, V. Y., and Martinek, K. (1981) Ultracentrifugation of reversed micelles in organic solvent: new approach to determination of molecular weight and effective size of proteins, *Anal. Biochem.*, **118**, 42-46, doi: 10.1016/0003-2697(81)90153-6.
17. Краснопецева М. К., Белик В. П., Богданов А. А., Семенова И. В., Смолин А. Г., Васютинский О. С. (2020) Определение времен затухания и анизотропии поляризованной флуоресценции флавиноаденидинуклеотида с субнаносекундным разрешением, *Письма ЖТФ*, **46**, 43-46, doi: 10.21883/PJTF.2020.12.49528.18234.
18. Kudryashova, E. V., Visser, A. J. W. G., and van Berkel, W. J. H. (2008) Monomer formation and function of p-Hydroxybenzoate hydroxylase in reverse micelles and dimethylsulfoxide/water mixtures, *ChemBioChem*, **9**, 413-419, doi: 10.1002/cbic.200700267.
19. Levashov, A. V. and Klyachko, N. L. (2001) Reverse micellar systems, *Methods Biotechnol.*, **15**, 575-586, doi: 10.1385/1-59259-112-4:575.
20. Tsui, F. C., Ojcius, D. M., and Hubbell, W. L. (1986) The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers, *Biophys. J.*, **49**, 459-468, doi: 10.1016/S0006-3495(86)83655-4.
21. Levashov, A. V., Ugolnikova, A. V., Ivanov, M. V., and Klyachko, N. L. (1997) Formation of homo-

- and heterooligomeric supramolecular structures by D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in reversed micelles of aerosol OT in octane, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 527-534, doi: 10.1080/15216549700202931.
22. Chatterley, A. S., Laity, P., Holland, C., Weidner, T., Woutersen, S., and Giubertoni, G. (2022) Broadband multidimensional spectroscopy identifies the amide II vibrations in silkworm films, *Molecules*, **27**, doi: 10.3390/molecules27196275.
 23. Кудряшова Е. В., Гладиллин А. К., Левашов А. В. (2002) Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии, *Усп. биол. химии*, **42**, 257-294.
 24. Jonas, A., and Drengler, S. M. (1977) Fluorescence polarization studies of human and rhesus a-i apolipoproteins and their complexes with phosphatidylcholine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1424-1430, doi: 10.1016/0006-291x(77)91451-6.
 25. Lolkema, J. S., and Slotboom, D. J. (2015) The Hill analysis and co-ion-driven transporter kinetics, *J. Gen. Physiol.*, **145**, 565-574, doi: 10.1085/jgp.201411332.
 26. Azimi, M., Nafissi-Varcheh, N., Faramarzi, M. A., and Aboofazeli, R. (2016) Laccase activity in CTAB-based water-in-oil microemulsions, *Iran J. Pharm. Res.*, **15**, 441-452.
 27. Kabanov, A. V., Nametkin, S. N., and Levashov, A. V. (1990) The principal difference in regulation of the catalytic activity of water-soluble and membrane forms of enzymes in reversed micelles. γ -Glutamyltransferase and aminopeptidase, *FEBS Lett.*, **267**, 236-238, doi: 10.1016/0014-5793(90)80933-a.
 28. Yang, Z., and Robb, D. A. (2005) Tyrosinase activity in reversed micelles, *Biocatal. Biotransform.*, **23**, 423-430, doi: 10.1080/10242420500387433.
 29. Gupte, A., Nagarajan, R., and Kilara, A. (1995) Enzymatic oxidation of cholesterol in reverse micelles, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **34**, 2910-2922, doi: 10.1021/ie00047a045.
 30. Чудин А. А., Злотников И. Д., Крылов С. С., Семенов В. В., Кудряшова Е. В. (2023) Ингибиторы галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* на основе аллилполиалкоксобензолов, *Биохимия*, **88**, 97-109, doi: 10.31857/S0320972523010074.

IMPACT OF LIPID MATRIX COMPOSITION ON THE ACTIVITY OF MEMBRANOTROPIC ENZYMES GALACTONOLACTONE OXIDASE FROM *Trypanosoma cruzi* AND L-GALACTONO-1,4-LACTONE DEHYDROGENASE FROM *Arabidopsis thaliana* IN THE SYSTEM OF REVERSE MICELLES

A. A. Chudin and E. V. Kudryashova*

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

The study of many membrane enzymes in an aqueous medium is difficult due to the loss of their catalytic activity, which makes it necessary to use membrane-like systems, such as reverse micelles of surfactants in nonpolar organic solvents. However, it should be taken into account that micelles are a simplified model of natural membranes, since membranes contain many different components, a significant part of which are phospholipids. In this work, we studied the impact of the main phospholipids, phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), on the activity of membrane enzymes using galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) and L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) as an examples. Effect of the structure (and charge) of the micelle-forming surfactant itself on the activity of both enzymes has been studied using an anionic surfactant (AOT), a neutral surfactant (Bridge-96), and a mixture of cationic and anionic surfactants (CTAB and AOT) as an examples. The pronounced effect of addition of PC and PE lipids on the activity of AtGALDH and TcGAL has been detected, which manifests as increase in catalytic activity and significant change in the activity profile. This can be explained by formation of the tetrameric form of enzymes and/or protein-lipid complexes. By varying composition and structure of the micelle-forming surfactants (AOT, CTAB, and Brijdge-96 and their combinations) it has been possible to change catalytic properties of the enzyme due to effect of the surfactant on the micelle size, lipid mobility, charge, and rigidity of the matrix itself.

Keywords: mixed micelles, cationic surfactants, galactonolactone dehydrogenase, phospholipids, *Trypanosoma cruzi*, *Arabidopsis thaliana*

НИЗКОЧАСТОТНЫЕ КОЛЕБАНИЯ ОЛИГОМЕРОВ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В ХЛОРОСОМАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ЗЕЛЁНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2023 А.Г. Яковлев*, А.С. Таисова, З.Г. Фетисова

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

Поступила в редакцию 06.06.2023

После доработки 17.07.2023

Принята к публикации 18.09.2023

При фотосинтезе в зелёных бактериях поглощение света происходит в олигомерах бактериохлорофилла (БХл) *c/d/e*, которые находятся в хлоросомах – уникальных структурах, созданных природой для собирания энергии очень слабых световых потоков. С помощью когерентной фемтосекундной спектроскопии при криогенной температуре мы обнаружили и исследовали низкочастотные колебательные движения олигомеров БХл *c* в хлоросомах зелёных бактерий *Chloroflexus (Cfx.) aurantiacus*. Объектом исследования были хлоросомы, выделенные из культур бактерий, выращенных при различной освещённости. Найдено, что спектр Фурье низкочастотных когерентных осцилляций в полосе Q_y БХл *c* хлоросом зависит от интенсивности света, при котором были выращены соответствующие культуры бактерий. Оказалось, что количество низкочастотных колебательных мод хлоросом увеличивается по мере уменьшения освещённости, при которой они культивировались. При этом расширяется диапазон частот, в пределах которого наблюдаются эти моды, и меняются частоты большинства мод. Теоретическое моделирование полученных данных и анализ литературы привели к выводу о том, что основу хлоросом *Cfx. aurantiacus* составляют короткие линейные цепи БХл *c*, объединённые в более сложные структуры. Увеличение длины этих цепей в хлоросомах, выращенных на более слабом свете, приводит к наблюдаемым изменениям спектра колебаний олигомеров БХл *c*. Это увеличение является эффективным механизмом адаптации бактерий к изменению внешних условий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, зелёные бактерии, хлоросома, когерентная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972523120102, EDN: NIYSVG

ВВЕДЕНИЕ

Преобразование солнечной энергии в химическую происходит исключительно благодаря фотосинтезу растений, водорослей и бактерий. Этот глобальный процесс полностью формирует фауну и флору на Земле и обуславливает само существование любых форм жизни. Процесс фотосинтеза начинается с поглощения света в различных светособирающих комплексах, основу которых в подавляющем большинстве организмов составляют молекулы хлорофилла (Хл) и бактериохлорофилла (БХл) различных видов [1, 2]. Энергия возбуждённых состояний этих молекул направляется в реакционные центры, где происходит её преобразование в электрическую энергию раз-

делённых зарядов. Эта электрическая энергия используется в сложной цепочке биохимических реакций, в результате которых синтезируются стабильные химические соединения. Изучение фотосинтеза имеет не только фундаментальный, но и чёткий прикладной аспект: создание высокоэффективных преобразователей солнечной энергии.

Зелёные фотосинтезирующие бактерии обладают способностью улавливать очень слабые световые потоки. Их уникальная светособирающая антенна – хлоросома – состоит из огромного количества (10^4 – 10^5) молекул БХл различных типов [3]. Эти молекулы обладают способностью объединяться в сложные трёхмерные структуры с помощью межмолекулярных сил взаимодействия [4, 5]. Отличи-

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл; Хл – хлорофилл; ΔA – разность поглощения (свет – темнота).

* Адресат для корреспонденции.

тельной особенностью хлоросом является то, что в них отсутствует белковая матрица, которая могла бы задавать положение молекул БХл в пространстве, как это имеет место во многих других светособирающих комплексах. Небольшое количество белка содержится в оболочке хлоросом, а также в базовой пластинке, с помощью которой хлоросома крепится к цитоплазматической мембране. Многочисленные данные, полученные различными методами спектроскопии, указывают на то, что основу пространственной организации хлоросом составляют квазилинейные цепи молекул БХл [6–10]. Эти цепи могут объединяться в более сложные структуры с помощью, например, водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса. Имеется большое количество теоретических моделей структуры хлоросом, которые опираются, в основном, на данные спектроскопии и микроскопии. Среди них можно выделить различные модели полых цилиндров [11–16], которые используют данные микроскопии замораживания-скальвания [17, 18]. Согласно одной из них, хлоросома зелёной бактерии *Chloroflexus (Cfx.) aurantiacus* состоит из примерно 10–20 цилиндров диаметром 5 нм, уложенных друг на друга в 1–3 слоя по несколько цилиндров в каждом слое [11] (рис. 1П в Приложении). Длина цилиндров соответствует продольному размеру хлоросомы (около 100 нм). Каждый длинный цилиндр поделен примерно на 15–17 одинаковых коротких цилиндров. В свою очередь, каждый короткий цилиндр состоит из 6 линейных цепей по несколько молекул БХл в каждой цепи. Подчеркнём, что данные микроскопии показывают лишь общий контур цилиндров, а представления о цепях молекул основаны исключительно на косвенных данных спектроскопии. Тем не менее, данная цилиндрическая модель удовлетворительно объясняет многие экспериментальные данные стационарной и нестационарной спектроскопии хлоросом с помощью теории экситонов. Цилиндрическая форма агрегатов БХл не является единственно возможной. Альтернативная модель структуры хлоросом предполагает наличие изогнутых двумерных плоскостей и основана на данных криоэлектронной микроскопии [19]. Ряд других моделей предполагает двуслойные цилиндры, полуцилиндры, спирали в виде рулонов, а также различные комбинации этих структур [16, 20–22]. Отметим, что в настоящий момент отдать предпочтение какой-либо одной модели не представляется возможным. При соответствующем выборе свободных параметров любая из перечисленных моделей способ-

на объяснить данные экспериментов. Только рентгеноструктурный анализ кристаллов хлоросом мог бы определить пространственные координаты всех атомов и тем самым дать возможность сделать окончательный выбор в пользу той или иной модели. К сожалению, синтезировать эти кристаллы до сих пор не удаётся.

Основной функцией хлоросом является аккумуляция световой энергии с последующей передачей энергии возбуждённых состояний БХл на базовую пластинку и далее к реакционному центру [2, 3]. Сразу после возбуждения в хлоросоме начинается миграция экситонов. Согласно квантово-химическим расчётам, в цилиндрической модели хлоросом перенос энергии внутри отдельных цилиндров происходит за ~50 фс, а между соседними цилиндрами — за ~100 фс [16]. Через ~500 фс после поглощения света возбуждение концентрируется в области, которая непосредственно примыкает к базовой пластинке. Далее происходит более медленный процесс переноса энергии экситонов на БХл *a* базовой пластинки с характерным временем ~10 пс. Миграция экситонов в хлоросоме сопровождается релаксацией их энергии, которая происходит в течение нескольких сотен фс после возбуждения. В хлоросомах *Cfx. aurantiacus* экситонная релаксация наблюдается при комнатной [14, 23] и криогенной [24] температурах. Процессы миграции, переноса и релаксации энергии отражаются в кинетиках поглощения и излучения хлоросом, имеющих сложную форму. Аппроксимация кинетик с помощью экспоненциальных функций выявляет характерные времена ~10, ~1 и ~0,1 пс [23–25].

Фемтосекундное возбуждение хлоросом может приводить к появлению когерентных осцилляций в кинетиках разностного (свет — темнота) поглощения. В хлоросомах *Cfx. aurantiacus* эти осцилляции были обнаружены при комнатной [25] и криогенной [12] температурах. Фурье-спектр осцилляций выявляет несколько мод, среди которых выделяются две интенсивные широкополосные моды с частотами ~150 и ~50 см⁻¹. Сравнение Фурье-спектров осцилляций с данными резонансного комбинационного рассеяния в хлоросомах [26] показывает близость частот мод, выявляемых обоими методами. Поскольку комбинационное рассеяние даёт спектр колебательных мод, это означает, что и когерентные осцилляции в хлоросомах имеют в основном колебательную природу. Это важное заключение открывает возможность изучить колебательные движения ядер атомов в хлоросомах по спектру

когерентных осцилляций. Особый интерес могут представлять низкочастотные колебательные моды, отвечающие коллективным движениям групп молекул, например, олигомеров БХл. В принципе, определив полный набор колебательных мод, можно решить обратную задачу и восстановить пространственную структуру БХл хлоросом. К сожалению, оба указанных метода спектроскопии дают информацию только о тех колебаниях, которые сопряжены с определённым оптическим переходом. Как правило, это несколько десятков мод в широком диапазоне частот от ~ 10 до $\sim 10^3 \text{ см}^{-1}$, в то время как общее количество нормальных мод даже в одной молекуле БХл достигает нескольких сотен [27]. В предыдущей работе мы попытались соотнести низкочастотные когерентные осцилляции в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* с колебаниями цепей БХл [28]. Чрезвычайно низкая амплитуда этих мод не позволила нам сделать однозначный вывод об их природе, хотя сам подход выглядел многообещающим. В настоящей работе мы повторили эту попытку с помощью качественно иной методики, которая заключалась в селективном возбуждении полосы Q_y хлоросом *Cfx. aurantiacus* с помощью узкополосных фемтосекундных импульсов. Длина волны импульсов возбуждения выбиралась таким образом, чтобы некогерентная компонента кинетик разностного (свет – темнота) поглощения ΔA была близка к нулю. Данный подход вместе с теоретическими оценками подтвердил предположение о том, что основу олигомерных агрегатов БХл *s* в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* составляют короткие цепи примерно линейной конфигурации. Этот вывод согласуется со многими литературными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры зелёной бактерии *Cfx. aurantiacus* (штамм Ok-70-f1) выращивали в анаэробных условиях при 55°C на стандартной среде [29] при постоянном перемешивании и разных интенсивностях света. Выделение хлоросом из клеток проводили как описано ранее [30]. Свежие клетки осаждали из культуральной среды центрифугированием при $10\,000 \text{ g}$ в течение 20 мин, ротор JA-20, двукратно промывали 10 mM Tris-HCl буфером (pH 8,0) и ресуспендировали 20 мл 50 mM Tris-HCl, содержащим 2 M тиоцианата натрия и 10 mM аскорбата натрия (ТТА-буфер). Клетки гомогенизировали, добавляли кристаллическую ДНКазу («Sigma», ФРГ) до концентрации 50 мкг/мл и 100 mM

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ до 2 mM . Суспензию инкубировали 15 мин в темноте при 4°C . Затем клетки разрушали путём трёхкратного пропускания через пресс Френча при $20\,000 \text{ psi}$. После добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), pH 7,0, до конечной концентрации 2 mM суспензию разрушенных клеток инкубировали 30 мин при слабом перемешивании в темноте при 4°C . Неразрушенные клетки и большие клеточные обломки отделяли центрифугированием при $20\,000 \text{ g}$ в течение 25 мин (ротатор JA-20). Полученный супернатант доводили до 24 мл ТТА-буфером и добавляли Triton-X100 до конечной концентрации $0,05\%$ (m/v). Непрерывный градиент сахарозы (от 55% до 20% , m/v) в ТТА-буфере готовили непосредственно в центрифужных стаканчиках. На каждый градиент сахарозы наносили по 4 мл супернатанта. После центрифугирования в течение 20 ч при $135\,000 \text{ g}$ ($26\,000 \text{ об./мин}$, ротор SW-27) при 4°C фракцию хлоросом отбирали в области $28\text{--}30\%$ градиента сахарозы.

Анализ спектров поглощения полученных фракций проводили на спектрофотометре Hitachi-557 («Hitachi», Япония) в диапазоне длин волн от 350 до 900 нм . Отбор хлоросомных фракций осуществляли по наличию поглощения в области 750 нм (поглощение БХл *s* хлоросом) и отсутствию поглощения в области $800\text{--}900 \text{ нм}$ (область поглощения светособирающей антенны мембраны). Для дальнейшей очистки полученные хлоросомные фракции объединяли и наносили на непрерывный градиент сахарозы (от 45% до 15%) в ТТА-буфере по $1,5 \text{ мл}$. Фракции хлоросом отбирали после центрифугирования в течение 20 ч при $135\,000 \text{ g}$ ($26\,000 \text{ об./мин}$, ротор SW-27) при 4°C .

Для измерения разностных (свет – темнота) спектров поглощения ΔA с фемтосекундным разрешением использовали лазерный спектрометр. Генерация световых импульсов длительностью 110 фс происходила в лазере на титан-сапфире с синхронизацией мод («Spectra Physics», США). Перестройку и фильтрацию длины волны излучения лазера в диапазоне $700\text{--}800 \text{ нм}$ проводили с помощью внутрирезонаторного фильтра. Ширина спектра лазерного излучения была 3 нм , а длина волны (736 нм) соответствовала пересечению спектров ΔA и нулевой линии (см. рис. 1). Лазерные импульсы усиливались в многопроходном усилителе на титан-сапфире («Авеста», Россия). Основная часть усиленного излучения фокусировалась в плоскую струю этиленгликоля для генерации фемтосекундного континуума, который использовался в качестве зондирующего света. Малая часть усиленного

излучения применялась для возбуждения хлоросом. Для регистрации спектров ΔA применяли оптический многоканальный анализатор на основе CCD-матрицы («Oriel», Франция), соединённый с монохроматором. Задержка между импульсами возбуждения и зондирования варьировала в диапазоне от $-0,2$ до 10 пс с точностью 1 фс. Угол между плоскостями поляризации возбуждающего и зондирующего света составлял $54,7^\circ$ (магический угол). Коэффициент поглощения образцов составлял $0,5$ на длине волны 750 нм, при этом доля возбуждённых хлоросом не превышала 10% . Для уменьшения уровня шумов применяли накопление и усреднение нескольких тысяч измерений при каждом значении задержки, а также охлаждение матрицы анализатора спектров. Кинетики ΔA строились для фиксированных длин волн на основе измеренных спектров ΔA . Измерения проводили при температуре 80 К, для чего образцы смешивались с глицерином в концентрации 65% (v/v).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Типичный стационарный спектр полосы поглощения Q_y хлоросом *Cfx. aurantiacus* представлен на рис. 1, а, а типичный спектр ΔA , измеренный через 200 фс после возбуждения, показан на рис. 1, б. Спектры поглощения и ΔA хлоросом, полученных при разной освещённости, имеют сильную качественную схожесть, хотя и отличаются количественно (рис. 2П в Приложении). Отрицательная полоса спектра ΔA с максимумом при 747 нм образована за счёт вынужденного излучения возбуждённого состояния олигомеров БХл *c* и выцветания полосы поглощения Q_y . Небольшая положительная полоса с максимумом при 732 нм отражает поглощение из возбуждённого состояния БХл *c*. Наличие отрицательной и положительной полос в области 730 – 760 нм спектра ΔA типично для агрегированных молекул БХл [23, 25]. При 736 нм спектр ΔA пересекает нулевую линию $\Delta A = 0$. При увеличении интервала времени между импульсами возбуждения и зондирования в пикосекундном диапазоне обе полосы спектра ΔA уменьшаются по амплитуде, что отражает основной процесс переноса энергии БХл *c* \rightarrow БХл *a* [23, 25]. Быстрые процессы экситонно-колебательной релаксации и миграции энергии по хлоросоме усложняют динамику этого процесса, приводя к мультиэкспоненциальной зависимости спектра ΔA от времени. При фемтосекундном возбуждении кинетика ΔA может стать ещё более

сложной за счёт появления когерентных осцилляций. Отделение этих осцилляций от неосциллирующей части кинетики ΔA является нетривиальной математической задачей в силу того, что неизвестно количество и параметры экспоненциальных функций, которые аппроксимируют кинетику ΔA . Ошибки при выборе аппроксимирующих функций могут серьёзно исказить выделенные осцилляции. Эта задача радикально упрощается для кинетики, измеренной на длине волны вблизи 736 нм, где спектр ΔA пересекает нулевой уровень (рис. 1, б). В этой области длин волн неосциллирующая часть кинетики ΔA очень близка к нулю и, что не менее важно, не зависит от времени в течение нескольких пс после возбуждения [25]. Таким образом, кинетика ΔA , измеренная при 736 нм, должна содержать только когерентные осцилляции.

На рис. 2–5 представлены кинетики ΔA и их спектры Фурье, измеренные на длине волны 736 нм, для хлоросом *Cfx. aurantiacus*, выделенных из бактериальных культур, выращенных при разных условиях освещённости. Для усиления когерентных осцилляций длина волны возбуждения была выбрана равной длине

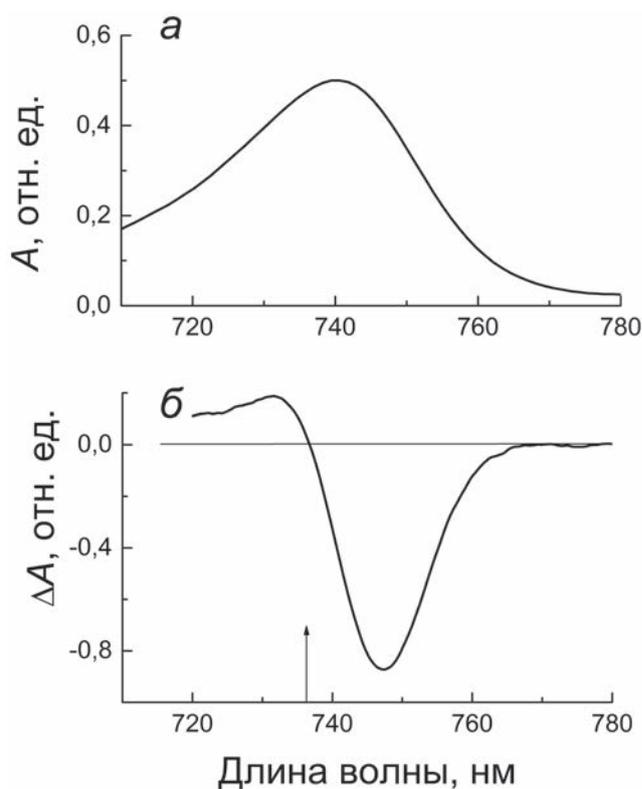


Рис. 1. Стационарный спектр полосы поглощения Q_y хлоросом *Cfx. aurantiacus* (а) и типичный спектр ΔA (свет – темнота), измеренный через 200 фс после возбуждения (б). Стрелкой показана область возбуждения образцов и измерения кинетик (736 нм)

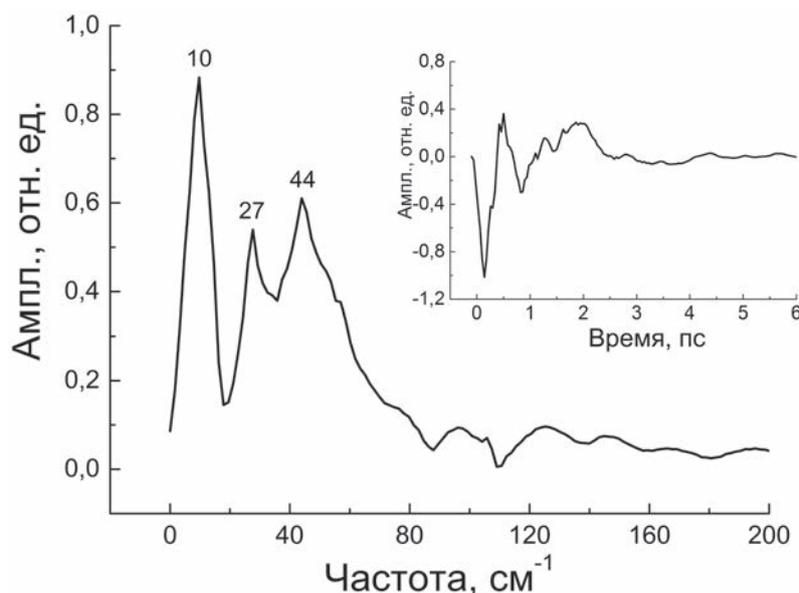


Рис. 2. Спектр Фурье кинетики ΔA хлоросом *Cfx. aurantiacus*, выделенных из бактериальных культур, выращенных при освещённости 6×10^{19} фот./м². Числа над кривой – частоты максимумов. На вставке – кинетика ΔA , измеренная на длине волны 736 нм

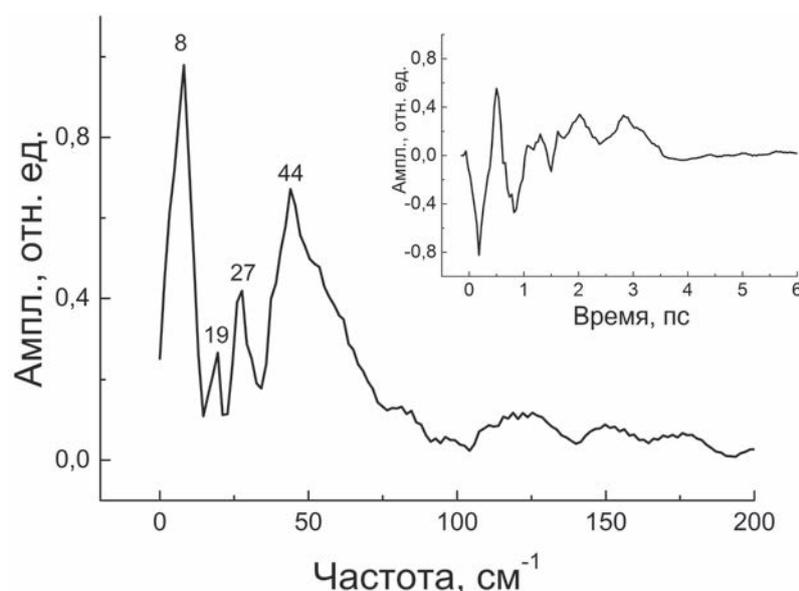


Рис. 3. Спектр Фурье кинетики ΔA хлоросом *Cfx. aurantiacus*, выделенных из бактериальных культур, выращенных при освещённости 3×10^{19} фот./м². Числа над кривой – частоты максимумов. На вставке – кинетика ΔA , измеренная на длине волны 736 нм

волны зондирования, то есть 736 нм. Как и ожидалось, кинетики ΔA представляют собой осцилляции сложной формы, затухающие в течение нескольких пс после возбуждения. Неосциллирующие экспоненциальные компоненты кинетик практически равны нулю. Преобразование Фурье, применённое к кинетикам, даёт информацию о характерных частотах осцилляций. При вычислении спектра Фурье мы не учитывали начальный этап кинетик (задержка < 200 фс), который мог быть искажён нарастающим возбуждением и интерферен-

цией между импульсами возбуждения и зондирования. Максимальная частота осцилляций, доступная для измерений, в основном определяется длительностью импульса возбуждения. Применение узкополосных импульсов длительностью 110 фс в нашей работе ограничило спектр Фурье максимальной частотой ~ 200 см⁻¹, однако позволило детально исследовать область более низких частот. Заметим, что применение для возбуждения хлоросом широкополосных импульсов меньшей длительности позволяет регистрировать более высокие

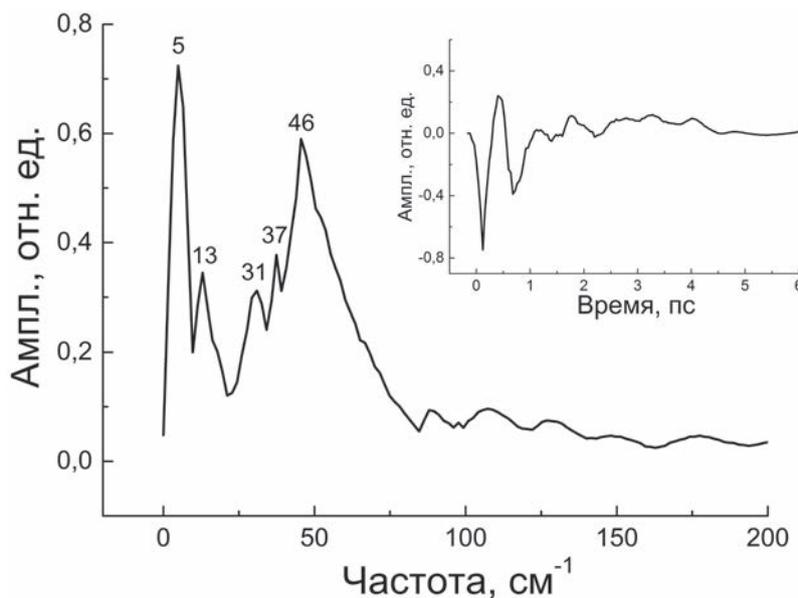


Рис. 4. Спектр Фурье кинетики ΔA хлоросом *Cfx. aurantiacus*, выделенных из бактериальных культур, выращенных при освещённости 6×10^{18} фот./м². Числа над кривой – частоты максимумов. На вставке – кинетика ΔA , измеренная на длине волны 736 нм

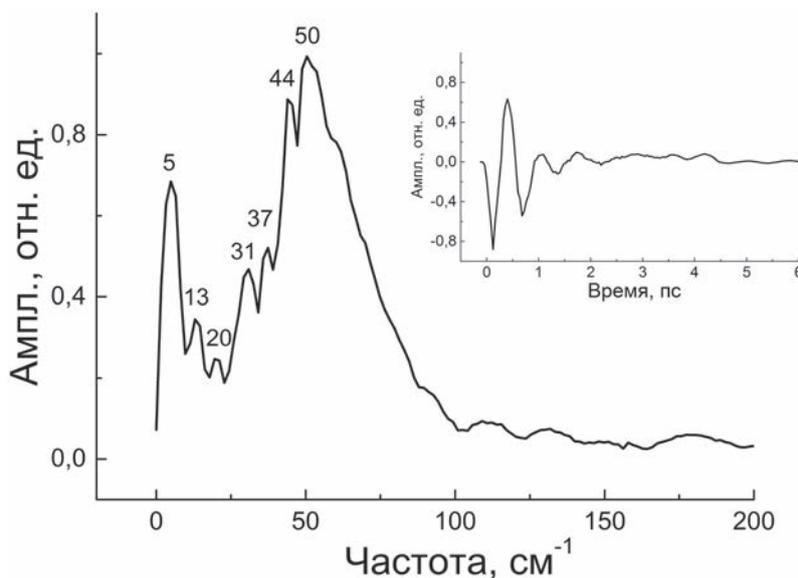


Рис. 5. Спектр Фурье кинетики ΔA хлоросом *Cfx. aurantiacus*, выделенных из бактериальных культур, выращенных при освещённости $1,2 \times 10^{18}$ фот./м². Числа над кривой – частоты максимумов. На вставке – кинетика ΔA , измеренная на длине волны 736 нм

частоты осцилляций, но затрудняет исследование области низких частот [28].

В хлоросомах, выращенных при достаточно сильной освещённости ($\sim 6 \times 10^{19}$ фот./м²), спектр Фурье когерентных осцилляций имеет наиболее простую форму с тремя основными пиками при 10, 27 и 44 см⁻¹ (рис. 2). Пики при 27 и 44 см⁻¹ входят, по-видимому, в широкую полосу с границами от ~ 20 до ~ 90 см⁻¹. Уменьшение освещённости культивирования вдвое приводит к тому, что в спектре Фурье осцилляций хлоросом наблюдаются четыре пика

при 8, 19, 27 и 44 см⁻¹ (рис. 3). Пик при 8 см⁻¹ является, скорее всего, аналогом пика при 10 см⁻¹ хлоросом, выращенных при сильной освещённости. Дальнейшее уменьшение освещённости культивирования в 10 раз приводит к следующему набору частот осцилляций: 5, 13, 31, 37 и 46 см⁻¹ (рис. 4). Два самых низкочастотных пика образуют, по-видимому, одну группу, а остальные три – другую. Наконец, хлоросомы, полученные при уменьшенной в 50 раз освещённости, демонстрируют следующие семь частот осцилляций: 5, 13, 20, 31, 37,

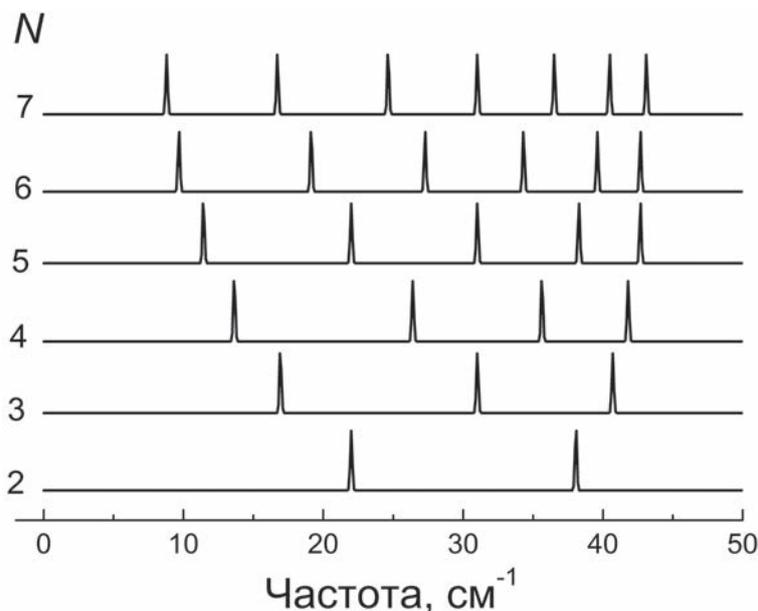


Рис. 6. Спектр колебаний линейной цепи из N одинаковых молекул массы m , соединённых пружинами с жёсткостью k , рассчитанный по формуле (1). Ширина отдельных пиков произвольна. Подробности – в тексте

44 и 50 см^{-1} (рис. 5). Мы видим, что по мере уменьшения освещённости, применяемой при культивировании бактериальных культур, увеличивается количество характерных частот когерентных осцилляций в хлоросомах. При этом несколько расширяется диапазон этих частот: от $10\text{--}44$ до $5\text{--}50 \text{ см}^{-1}$.

Заметим, что для всех хлоросом наибольшую амплитуду имеют два пика в спектрах Фурье: один – с самой низкой частотой, и другой – самый высокочастотный. Для сравнения мы провели анализ кинетик, полученных при возбуждении и зондировании хлоросом на длине волны 750 нм , примерно соответствующей максимуму вынужденного излучения (рис. 3П–5П в Приложении). Оказалось, что количество Фурье-компонент и их частоты не зависят от длины волны возбуждения, меняются лишь их относительные амплитуды. В целом, возбуждение на длине волны 736 нм даёт более чёткую картину осцилляций с меньшим количеством шумов, чем возбуждение на длине волны 750 нм .

Для теоретического моделирования полученных данных мы использовали представление о колебаниях линейной цепи, состоящей из N одинаковых молекул массы m , соединённых между собой упругими связями в виде пружин с жёсткостью k . Собственные частоты колебаний такой цепи ω_n выражаются простой формулой (1) [31]:

$$\omega_n = 2(k/m)^{0.5} |\sin(\pi n / 2(N+1))|, \quad (1) \\ n = 1, 2 \dots N.$$

На рис. 6 представлены спектры колебаний такой линейной цепи для разных значений N . Количество характерных частот колебаний равно количеству молекул в цепи. При увеличении числа N диапазон частот расширяется как в сторону более низких, так и в сторону более высоких частот. При $N \gg 1$ большая часть частот группируется вблизи нижней и верхней границ диапазона, при этом минимальная частота стремится к нулю. Наиболее важный вывод состоит в том, что для оценки количества молекул в цепи достаточно сосчитать количество пиков в спектре колебаний цепи. Возвращаясь к нашим экспериментальным данным (рис. 2–5), мы видим, что количество пиков в спектрах Фурье осцилляций варьирует от 3 до 7. Предполагая, что эти пики отражают колебания линейных цепей молекул БХл c , составляющих основу хлоросом *Cfx. aurantiacus*, мы приходим к выводу, что эти цепи состоят из 3–7 молекул БХл c . Аналогичный вывод был сделан нами ранее по результатам исследования гиперхромизма спектров поглощения хлоросом [32], а также по особенностям спектров кругового дихроизма и фемтосекундных спектров ΔA [33]. Придерживаясь цилиндрической модели, можно заключить, что вдоль длинной оси хлоросомы *Cfx. aurantiacus* уместается около 15 коротких цепей БХл c , если их располагать одну за другой. При этом длина каждой короткой цепи примерно равна 6 нм . Отметим, что ячеистое строение с тем же периодом 6 нм характерно для паракристаллической структуры базовой пластинки *Cfx. aurantiacus* [17, 18].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опираясь на полученные данные, интересно оценить по порядку величины энергии межмолекулярных связей в агрегатах БХл с хлоросом. Зная массу m молекулы БХл ~ 900 а.е.м. = $1,6 \times 10^{-24}$ кг [1] и полагая частоту межмолекулярных колебаний $\omega_0 \sim 10$ см $^{-1}$ или $\sim 2 \times 10^{12}$ Гц, оценим жёсткость связи $k = \omega_0^2 m \sim 1,3$ Дж/м 2 . Полагая среднюю длину координационной связи между соседними молекулами БХл в цепи $L \sim 1-2$ Å [34], оценим энергию связи $U = kL^2/2 \sim 2 \times 10^{-20}$ Дж или ~ 1000 см $^{-1}$. Эта энергия соответствует характерной энергии водородных связей, которые играют определяющую роль в формировании агрегатов БХл в хлоросомах [4].

Учёт внутримолекулярных колебательных движений в хлоросомах значительно усложняет интерпретацию полученных данных. Спектроскопия резонансного комбинационного рассеяния в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* даёт следующие значения низкочастотных колебательных мод: 63, 94, 120, 148, 162, 183, 214, 272, 291, 315, 360 и 384 см $^{-1}$, причём наибольшую амплитуду имеют моды при 94, 120 и 148 см $^{-1}$ [26]. Обнаружение мод с частотами менее 60 см $^{-1}$ затруднительно для данного вида спектроскопии. Кроме того, в спектре комбинационного рассеяния хлоросом имеется целый ряд слабых высокочастотных мод вплоть до частот ~ 2000 см $^{-1}$. Эти высокочастотные моды идентифицированы с достаточной точностью: они соответствуют колебаниям отдельных атомов и небольших атомных групп, принадлежащих одной и той же молекуле БХл. Низкочастотные моды хлоросом до сих пор не идентифицированы, однако считается несомненным, что они соответствуют колебаниям больших фрагментов молекул БХл. Более того, ряд мод может охватывать атомы, принадлежащие не одной, а двум и более соседним молекулам БХл. В этом контексте разделение колебательных мод хлоросом на межмолекулярные и внутримолекулярные выглядит достаточно условным. Расчёты *ab initio* спектральной плотности для модели хлоросомы, состоящей из многослойных рулонов, выявили ряд низкочастотных мод и более интенсивных высокочастотных мод, сопряжённых с оптическим переходом Q_y [22]. В этих расчётах низкочастотные моды представляли межмолекулярные колебания в отдельных слоях молекул БХл.

Расчёт нормальных мод для изолированных молекул БХл даёт следующие значения частот самых медленных колебаний: 3, 9, 20, 23, 27, 35, 40, 44 и 47 см $^{-1}$ [27]. Все эти моды силь-

но делокализованы по 10–40 атомам. Наиболее сильная мода при 35 см $^{-1}$ отвечает деформациям тетрапиррольного кольца и либрациям ацетильной группы. Для мод при 3, 9, 20 и 23 см $^{-1}$ характерны движения фитольного хвоста и тетрапиррольного кольца как целых независимых частей, в то время как у мод с большими частотами эти движения сильно перемешаны. Мода при 9 см $^{-1}$ имеет максимальную делокализацию: она представляет движения 55 атомов, которые принадлежат центральному кольцу, боковым цепям и фитольному хвосту. Эти движения можно представить себе как либрацию центральной части молекулы БХл вокруг оси C5MgC10 и либрацию фитольного хвоста, причём эти два вида либраций происходят в протифазе.

Моделирование колебаний линейной цепи молекул БХл в терминах связанных колебательных мод возможно с помощью одномерной модели N одинаковых физических маятников, соединённых пружинами [31]. Каждый маятник представляет определённую колебательную моду отдельной молекулы БХл. Собственные частоты колебаний такой цепи маятников ω_n можно записать так (2):

$$\omega_n^2 = g/l + (4k/m) \sin^2(\pi n/2N), \quad (2)$$

$$n = 0, 1, 2 \dots N-1,$$

где g – ускорение силы тяжести, l – длина маятника, m – масса маятника, k – жёсткость пружин. Формула (2) очень похожа на формулу (1), с той лишь разницей, что минимальная частота колебаний цепи маятников равна собственной частоте каждого маятника $(g/l)^{0.5}$. Собственные частоты колебаний цепи маятников находятся в диапазоне от $(g/l)^{0.5}$ до $(g/l + 4k/m)^{0.5}$, причём количество колебательных мод равно числу маятников в цепи. Из анализа рис. 2–5 можно видеть, что $(g/l)^{0.5} \sim 10$ см $^{-1}$ и $(g/l + 4k/m)^{0.5} \sim 50$ см $^{-1}$, откуда получаем оценку $2(k/m)^{0.5} \sim 20$ см $^{-1}$. Как и ожидалось, эта оценка близка к полученной по формуле (1), что подтверждает близость внутримолекулярных и межмолекулярных частот колебательных мод в диапазоне очень низких частот 10–100 см $^{-1}$. Тем не менее, общий вывод для обоих типов колебаний одинаков: если олигомеры БХл имеют форму линейных цепей, количество колебательных мод равно количеству молекул в цепи.

Подчеркнём, что представление об одномерных колебаниях линейных цепей является очевидным упрощением. В реальной хлоросоме колебания происходят в трёх измерениях, а цепи олигомеров БХл могут иметь изогнутую форму. Когерентная спектроскопия может

регистрировать только те колебания, которые сопряжены с определённым оптическим переходом, то есть имеют ненулевую проекцию на оптическую ось этого перехода. В нашем случае это переход Q_y , ось которого расположена в плоскости центрального кольца БХл и проходит через атомы азота первого и третьего пиррольных колец и атом магния [1]. Согласно моделированию данных спектроскопии, угол наклона центрального кольца БХл относительно длинной оси хлоросом составляет $37 \pm 5^\circ$ в рамках цилиндрической модели, а цепи БХл располагаются параллельно длинной оси [12]. В олигомеризации БХл хлоросом принимают участие связи между центральным атомом магния и боковыми цепями соседних молекул [4–5]. Таким образом, сжатие-растяжение связей между соседними молекулами БХл происходит преимущественно вдоль длинной оси хлоросом и имеет проекцию на ось перехода Q_y , пропорциональную $\cos(37 \pm 5^\circ)$. Другие типы колебаний (изгиб и кручение) этих связей имеют, скорее всего, сверхнизкие частоты, недоступные для регистрации методами когерентной спектроскопии. В общем случае изогнутой цепи БХл направление колебаний может не совпадать с длинной осью хлоросомы. Более того, различные колебательные моды могут иметь разные направления и, следовательно, их проекции на оси Q_y могут быть существенно разными. В этом контексте разное количество регистрируемых мод в хлоросомах, приготовленных в разных условиях (например, при разной освещённости), может указывать на отличия в их стереометрии даже при одинаковой длине цепей БХл.

Интересно сравнить наши данные когерентной спектроскопии хлоросом *Cfx. aurantiacus* с аналогичными данными о других фотосинтезирующих объектах. Ближайший родственник *Cfx. aurantiacus* – зелёная серная бактерия *Chlorobium (Cb.) tepidum* – имеет самую большую хлоросому, состоящую из более чем 10^5 молекул БХл *c/d* в агрегированном состоянии [3]. Это в несколько раз больше, чем в хлоросоме *Cfx. aurantiacus*. Согласно данным теоретического моделирования, олигомеры БХл в хлоросомах *Cb. tepidum* могут образовывать цилиндры, стенки которых представляют собой плотно упакованные слои молекул БХл [12]. Самые низкочастотные моды когерентных осцилляций в спектрах ΔA хлоросом *Cb. tepidum* имеют характерные частоты 5, 17, 52 и 76 см^{-1} , причём наиболее сильная мода имеет частоту 17 см^{-1} [35]. Две моды при 5 и 17 см^{-1} в сумме перекрывают диапазон $2\text{--}30 \text{ см}^{-1}$. Частоты этих мод весьма близки к таковым для хлоросом *Cfx. aurantiacus*, полученных при слабой освещённости (5 и 13 см^{-1} , рис. 4 и 5).

В реакционных центрах пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* когерентные осцилляции с частотами при 8, 30, 44 и 67 см^{-1} наблюдаются в возбуждённом состоянии димера БХл *a*, причём мода с частотой 8 см^{-1} имеет максимальную амплитуду [36]. Частоты 8, 30 и 44 см^{-1} близки к таковым для хлоросом *Cfx. aurantiacus*, полученных при сильной освещённости (рис. 2). Для этих хлоросом оценочное количество молекул БХл в каждой цепи составляет 3, что всего на 1 молекулу больше, чем в димере реакционных центров. Когерентная двумерная электронная спектроскопия мономерных молекул Хл *a* показала отсутствие заметных осцилляций с частотами менее 260 см^{-1} [37]. К аналогичному выводу для частот ниже 115 см^{-1} привели данные резонансного комбинационного рассеяния мономерных молекул Хл *a* [38]. Когерентная спектроскопия базовой пластинки хлоросом *Cfx. aurantiacus*, которая содержит мономерные молекулы БХл *a* в качестве основного пигмента, показала полное отсутствие осцилляций [25].

В нашей работе мы использовали хлоросомы, выделенные из культур фотосинтезирующей бактерии *Cfx. aurantiacus*, выращенных при разной освещённости. Оказалось, что чем ниже эта освещённость, тем больше длина цепей БХл *c*, составляющих структурную основу хлоросом. К такому же выводу приводят и многочисленные данные, полученные с использованием различных методик [11, 33, 39]. Установлено, что размер хлоросом и количество молекул основного пигмента увеличиваются по мере уменьшения интенсивности культивирующего света, что обеспечивает выживание зелёных бактерий в условиях возрастающего дефицита света. При неизменной структуре хлоросомы большего размера должны иметь меньшую эффективность переноса энергии к базовой пластинке за счёт увеличения потерь на спонтанное излучение и увеличения среднего времени миграции энергии по хлоросоме. Чтобы компенсировать этот негативный эффект, природа вносит изменения в структуру хлоросом. Одним из способов этого является увеличение размеров элементарных блоков хлоросом за счёт удлинения цепей БХл. Это увеличивает вероятность захвата фотонов каждым блоком. Кроме того, миграция энергии экситонов вдоль цепей БХл происходит с максимальной скоростью за счёт сильного сопряжения соседних молекул [16]. Другим способом сохранения высокой эффективности переноса энергии в больших хлоросомах является уплотнение упаковки молекул БХл.

Ярким примером этого служит бактерия *Cb. tepidum*, хлоросома которой в несколько раз больше, чем у *Cfx. aurantiacus*, однако среднее время переноса энергии на базовую пластинку примерно такое же, то есть 10–20 пс [12]. Предполагается, что цилиндрические структуры хлоросом *Cb. tepidum* являются многослойными и представляют собой или 2–3 цилиндра разного диаметра, вложенные один в другой, или трёхмерные цилиндрические рулоны. Очевидно, характерные частоты колебаний таких структур имеют нижнюю границу много меньше 1 см^{-1} . Исследование этих сверхнизких частот является интересной и перспективной задачей в контексте выяснения физических основ функционирования хлоросом. Знание этих основ может помочь в решении глобальной задачи создания высокоэффективных искусственных преобразователей солнечной энергии.

Вклад авторов. А.Г. Яковлев – проведение экспериментов, написание статьи; А.С. Таисова – приготовление образцов, перевод статьи на английский язык; З.Г. Фетисова – руководство работой.

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность покойному академику В.А. Шувалову за общую поддержку и постоянный интерес к их работе.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств госзадания «Фотобиофизика преобразования солнечной энергии в живых системах» (№ АААА-А17-117120540070-0).

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. Clayton, R. (1980) *Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns*, Cambridge University Press, USA.
2. Mirkovic, T., Ostroumov, E., Anna, J., van Grondelle, R., Govindjee, and Scholes, G. (2017) Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms, *Chem. Rev.*, **117**, 249–293, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00002.
3. Frigaard, N.-U., and Bryant, D. (2006) Chlorosomes: antenna organelles in green photosynthetic bacteria, in *Complex intracellular structures in prokaryotes. Microbiology monographs* (Shively, J. M., ed), vol. 2, Springer, Berlin, pp. 79–114, doi: 10.1007/7171_021.
4. Krasnovsky, A., and Bystrova, M. (1980) Self-assembly of chlorophyll aggregated structures, *BioSystems*, **12**, 181–194, doi: 10.1016/0303-2647(80)90016-7.
5. Smith, K., Kehres, L., and Fajer, J. (1983) Aggregation of bacteriochlorophylls *c*, *d* or *e*. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1387–1389, doi: 10.1021/ja00343a062.
6. Van Dorssen, R. J., Vasmel, H., and Amesz, J. (1986) Pigment organization and energy transfer in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. II. The chlorosome, *Photosynth. Res.*, **9**, 33–45, doi: 10.1007/BF00029729.
7. Fetisova, Z., Freiberg, A., and Timpmann, K. (1988) Long-range molecular order as an efficient strategy for light harvesting in photosynthesis, *Nature (London)*, **334**, 633–634, doi: 10.1038/334633a0.
8. Fetisova, Z., and Muring, K. (1992) Experimental evidence of oligomeric organization of antenna bacteriochlorophyll *c* in green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* by spectral hole burning, *FEBS Lett.*, **307**, 371–374, doi: 10.1016/0014-5793(92)80715-s.
9. Fetisova, Z., and Muring, K. (1993) Spectral hole burning study of intact cells of green bacterium *Chlorobium limicola*, *FEBS Lett.*, **323**, 159–162, doi: 10.1016/0014-5793(93)81470-k.
10. Fetisova, Z., Muring, K., and Taisova, A. (1994) Strongly exciton coupled BChl *e* chromophore system in chlorosomal antenna of intact cells of green bacterium *Chlorobium phaeovibrioides*: A spectral hole burning study, *Photosynth. Res.*, **41**, 205–210, doi: 10.1007/BF02184161.
11. Fetisova, Z., Freiberg, A., Muring, K., Novoderezhkin, V., Taisova, A., and Timpmann, K. (1996) Excitation energy transfer in chlorosomes of green bacteria: theoretical and experimental studies, *Biophys. J.*, **71**, 995–1010, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79301-3.
12. Prokhorenko, V. I., Steensgaard, D. B., and Holzwarth, A. R. (2000) Exciton dynamics in the chlorosomal antennae of the green bacteria *Chloroflexus aurantiacus* and *Chlorobium tepidum*, *Biophys. J.*, **79**, 2105–2120, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76458-7.
13. Muring, K., Novoderezhkin, V., Taisova, A., and Fetisova, Z. (1999) Exciton levels structure of antenna bacteriochlorophyll *c* aggregates in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* as probed by 1.8–293 K fluorescence spectroscopy, *FEBS Lett.*, **456**, 239–242, doi: 10.1016/s0014-5793(99)00953-9.
14. Martiskainen, J., Linnanto, J., Kananavičius, R., Lehtovuori, V., and Korppi-Tommola, J. (2009) Excitation energy transfer in isolated chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus*, *Chem. Phys. Lett.*, **477**, 216–220, doi: 10.1016/j.cplett.2009.06.080.

15. Martiskainen, J., Linnanto, J., Aumanen, V., Myllyperkiö, P., and Korppi-Tommola, J. (2012) Excitation energy transfer in isolated chlorosomes from *Chlorobaculum tepidum* and *Prosthecochloris aestuarii*, *Photochem. Photobiol.*, **88**, 675–683, doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01098.x.
16. Linnanto, J. V., and Korppi-Tommola, J. E. I. (2012) Exciton description of chlorosome to baseplate excitation energy transfer in filamentous anoxygenic phototrophs and green sulfur bacteria, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11144–11161, doi: 10.1021/jp4011394.
17. Staehelin, L., Golecki, J., Fuller, R., and Drews, G. (1978) Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (*Chlorobium* type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*, *Arch. Microbiol.*, **119**, 269–277, doi: 10.1007/BF00405406.
18. Sprague, S., Staehelin, L., DiBartolomeis, M., and Fuller, R. (1981) Isolation and development of chlorosomes in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Bacteriol.*, **147**, 1021–1031, doi: 10.1128/jb.147.3.1021-1031.1981.
19. Psencik, J., Ikonen, T. P., Laurinmaki, P., Merckel, M. C., Butcher, S. J., Serimaa, R. E., and Tuma, R. (2004) Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria, *Biophys. J.*, **87**, 1165–1172, doi: 10.1529/biophysj.104.040956.
20. Günther, L., Jendry, M., Bloemsma, E., Tank, M., Oostergetel, G., Bryant, D., Knoester, J., and Köhler, J. (2016) Structure of light-harvesting aggregates in individual chlorosomes, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 5367–5376, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b03718.
21. Sawaya, N., Huh, J., Fujita, T., Saikin, S., and Aspuru-Guzik, A. (2015) Fast delocalization leads to robust long-range excitonic transfer in a large quantum chlorosome model, *Nano Lett.*, **15**, 1722–1729, doi: 10.1021/nl504399d.
22. Fujita, T., Huh, J., Saikin, S., Brookes, J., and Aspuru-Guzik, A. (2014) Theoretical characterization of excitation energy transfer in chlorosome light-harvesting antennae from green sulfur bacteria, *Photosynth. Res.*, **120**, 273–289, doi: 10.1007/s11120-014-9978-7.
23. Yakovlev, A. G., Taisova, A. S., and Fetisova, Z. G. (2021) Utilization of blue-green light by chlorosomes from the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: Ultrafast excitation energy conversion and transfer, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148396, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148396.
24. Savikhin, S., Zhu, Y., Blankenship, R. E., and Struve, W. S. (1996) Intraband energy transfers in the BChl *c* antenna of chlorosomes from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Phys. Chem.*, **100**, 17978–17980, doi: 10.1021/jp961752b.
25. Savikhin, S., Zhu, Y., Lin, S., Blankenship, R. E., and Struve, W. S. (1994) Femtosecond spectroscopy of chlorosome antennas from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Phys. Chem.*, **98**, 10322–10334, doi: 10.1021/j100091a056.
26. Cherepy, N. J., Du Mei, Holzwarth, A. R., and Mathies, R. A. (1996) Near-infrared resonance Raman spectra of chlorosomes: probing nuclear coupling in electronic energy transfer, *J. Phys. Chem.*, **100**, 4662–4671, doi: 10.1021/jp952992e.
27. Klevanik, A. V. (2001) Low frequency vibrations of bacteriochlorophyll, *Optics Spectroscopy*, **90**, 55–66, doi: 10.1134/1.1343547.
28. Yakovlev, A. G., Taisova, A. S., Shuvalov, V. A., and Fetisova, Z. G. (2018) Estimation of the bacteriochlorophyll *c* oligomerisation extent in *Chloroflexus aurantiacus* chlorosomes by very low-frequency vibrations of the pigment molecules: A new approach, *Biophys. Chem.*, **240**, 1–8, doi: 10.1016/j.bpc.2018.05.004.
29. Pierson, B., and Castenholz, R. (1974) Studies of pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium, *Arch. Microbiol.*, **100**, 283–305, doi: 10.1007/BF00446324.
30. Taisova, A. S., Keppen, O. I., Lukashev, E. P., Arutyunyan, A. M., and Fetisova, Z. G. (2002) Study of the chlorosomal antenna of the green mesophilic filamentous bacterium *Oscillochloris trichoides*, *Photosynth. Res.*, **74**, 73–85, doi: 10.1023/A:1020805525800.
31. Трубецков Д. И., Рожнев А. Г. (2001) *Линейные колебания и волны*, Физматлит, Москва.
32. Yakovlev, A. G., Taisova, A. S., and Fetisova, Z. G. (2020) Q-band hyperchromism and B-band hypochromism of bacteriochlorophyll *c* as a tool for investigation of the oligomeric structure of chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *Photosynth. Res.*, **146**, 95–108, doi: 10.1007/s11120-019-00707-9.
33. Yakovlev, A., Taisova, A., Arutyunyan, A., Shuvalov, V., and Fetisova, Z. (2017) Variability of aggregation extent of light-harvesting pigments in peripheral antenna of *Chloroflexus aurantiacus*, *Photosynth. Res.*, **133**, 343–356, doi: 10.1007/s11120-017-0374-y.
34. Глинка Н. Л. (1975) *Общая химия*, «Химия», Ленинград.
35. Savikhin, S., van Noort, P. I., Zhu, Y., Lin, S., Blankenship, R. E., and Struve, W. S. (1995) Ultrafast energy transfer in light-harvesting chlorosomes from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*, *Chem. Phys.*, **194**, 245–258, doi: 10.1016/0301-0104(95)00019-k.
36. Yakovlev, A. G., Shkuropatov, A. Ya., and Shuvalov, V. A. (2002) Nuclear wavepacket motion between P* and P⁺B_A⁻ potential surfaces with a subsequent electron transfer to H_A in bacterial reaction centers at 90 K. Electron transfer pathway, *Biochemistry*, **41**, 14019–14027, doi: 10.1021/bi02025n.
37. Meneghin, E., Leonardo, C., Volpato, A., Bolzonello, L., and Collini, E. (2017) Mechanistic insight into internal conversion process within Q-bands of

- chlorophyll *a*, *Sci. Rep.*, **7**, 11389, doi: 10.1038/s41598-017-11621-2.
38. Lutz, M. (1977) Antenna chlorophyll in photosynthetic membranes. A study by resonance Raman spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 408-430, doi: 10.1016/0005-2728(77)90081-0.
39. Novoderezhkin, V. I., Taisova, A. S., and Fetisova, Z. G. (2001) Unit building block of the oligomeric chlorosomal antenna of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: modeling of nonlinear optical spectra, *Chem. Phys. Lett.*, **335**, 234-240, doi: 10.1016/S0009-2614(01)00045-8.

LOW-FREQUENCY VIBRATIONS OF BACTERIOCHLOROPHYLL OLIGOMERS IN CHLOROSOMES OF PHOTOSYNTHETIC GREEN BACTERIA

A. G. Yakovlev*, A. S. Taisova, and Z. G. Fetisova

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: yakov@belozersky.msu.ru*

In green photosynthetic bacteria, light absorption occurs in bacteriochlorophyll (BChl) *c/d/e* oligomers, which are located in chlorosomes – unique structures created by nature to collect the energy of very weak light fluxes. Using coherent femtosecond spectroscopy at cryogenic temperature, we detected and studied low-frequency vibrational motions of BChl *c* oligomers in the chlorosomes of the green bacteria *Chloroflexus (Cfx.) aurantiacus*. The objects of the study were chlorosomes isolated from bacterial cultures grown under different light intensity. It was found that the Fourier spectrum of low-frequency coherent oscillations in the Q_y band of BChl *c* oligomers depends on the light intensity used for the growth of bacteria. It turned out that the number of low-frequency vibrational modes of chlorosomes increases as the illumination under which they were cultivated decreases. Also, the frequency range within which these modes are observed expands, and the frequencies of most modes change. Theoretical modeling of the obtained data and analysis of the literature led to the conclusion that the structural basis of *Cfx. aurantiacus* chlorosomes are short linear chains of BChl *c* combined into more complex structures. An increase in the length of these chains in chlorosomes grown under weaker light leads to the observed changes in the spectrum of vibrations of BChl *c* oligomers. This increase is an effective mechanism for the adaptation of bacteria to changing external conditions.

Keywords: photosynthesis, green bacteria, chlorosome, coherent spectroscopy

ДЕЙСТВИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА АДГЕЗИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА И СОПУТСТВУЮЩУЮ СЕКРЕЦИЮ

© 2023 С.И. Галкина^{1*}, Е.А. Голенкина¹, Н.В. Федорова¹, А.Л. Ксенофонтов¹,
М.В. Серебрякова¹, В.И. Стадничук², Л.А. Баратова¹, Г.Ф. Судьина^{1*}

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

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

Поступила в редакцию 26.07.2023

После доработки 17.10.2023

Принята к публикации 20.10.2023

Нейтрофилы играют двойственную роль в защите организма. Они способны проникать в инфицированные ткани и уничтожать там болезнетворные микроорганизмы, выделяя агрессивные бактерицидные вещества. Попадая в окружающие ткани, агрессивные продукты секреции нейтрофилов инициируют развитие воспалительных процессов. Инвазия нейтрофилов в ткани наблюдается при развитии пневмонии у пациентов с легочными заболеваниями различной этиологии, включая острый респираторный дистресс-синдром при коронавирусной инфекции. Синтетический кортикостероидный гормон дексаметазон оказывает терапевтическое действие при лечении заболеваний легких, в том числе снижает смертность пациентов с тяжелым течением COVID-19. Мы изучили острые (краткосрочные) эффекты дексаметазона на адгезию нейтрофилов к фибриногену и сопутствующую секрецию. Дексаметазон не влиял ни на прикрепление нейтрофилов к субстрату, ни на их морфологию. Продукция активных форм кислорода и оксида азота нейтрофилами в процессе адгезии также не изменялась в присутствии дексаметазона. Дексаметазон стимулировал высвобождение металлопротеиназы в дополнение к белкам, секретиремым нейтрофилами при адгезии в контрольных условиях, и избирательно стимулировал высвобождение свободной аминокислоты гидроксизина, продукта лизилгидроксилазы. Металлопротеиназы играют ключевую роль и тесно взаимодействуют с лизилгидроксилазой в процессах перестройки внеклеточного матрикса. Терапевтический эффект дексаметазона может быть связан с его способностью через изменение состава секреции нейтрофилов реорганизовывать внеклеточный матрикс, следствием чего может быть улучшение газообмена у больных с тяжелым течением легочных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейтрофильное воспаление, нейтрофил, адгезия, секреция, гидроксизин, металлопротеиназа, лизилгидроксилаза, активные формы кислорода, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0320972523120114, **EDN:** NRPREO

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы играют двоякую роль в возникновении и течении воспаления. Они вносят вклад в защиту организма от инфекций благодаря способности мигрировать из кровеносных сосудов в инфицированные ткани и уничтожать вторгшиеся патогенные микробы, секретировав бактерицидные агенты. Те же самые агрессивные бактерициды могут вызвать

развитие воспаления в окружающих тканях хозяина. Интегрин-зависимая адгезия нейтрофилов к тканям, сопровождающаяся секрецией противовоспалительных медиаторов, происходит при реперфузии после ишемии и на ранних стадиях диабета [1–3]. Инвазия нейтрофилов в легкие наблюдается также при развитии пневмонии у больных муковисцидозом, хронической обструктивной болезнью легких и другими легочными заболеваниями, включая

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ЛГ – лизилгидроксилаза; MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; HBSS – сбалансированный солевой раствор Хенкса; DAF-2 – диаминофлуоресцеин; DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин; D-PBS – фосфатно-солевой буфер Дульбекко; PMA – форбол 12-миристанат 13-ацетат.

* Адресат для корреспонденции.

острый респираторный дистресс-синдром при заболевании COVID-19 [4–7]. Количество нейтрофилов значительно увеличивается в крови у пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом при коронавирусной болезни. Это увеличение, наряду с увеличением числа нейтрофилов по отношению к числу лимфоцитов, рассматривается как предвестник критического состояния и смертности пациентов [8].

Дексаметазон, синтетический глюкокортикоидный гормон (аналог преднизолона), снижает смертность у пациентов с тяжелой формой COVID-19, но механизм его действия еще предстоит выяснить [9–13]. Терапевтический эффект дексаметазона, по крайней мере частично, заключается в воздействии на активность нейтрофилов, агрессивная секреция которых рассматривается как возможная причина развития воспалений при остром респираторном дистресс-синдроме. Применение дексаметазона у пациентов с тяжелым течением COVID-19 приводило к снижению общего количества нейтрофилов и количества IFN-активных нейтрофилов, а также к увеличению количества незрелых иммуносупрессивных нейтрофилов [14].

Целью нашей работы было изучение действия дексаметазона на функциональные ответы нейтрофилов, связанные с инвазией этих клеток в ткани и их способностью инициировать воспалительные процессы. Дексаметазон, как и другие глюкокортикоиды, действует через геномный путь, но также вызывает быстрые негеномные ответы, связанные с его действием на биологические мембраны [15–17]. Зрелые нейтрофилы лишены способности к делению, и синтез белка и мРНК у них значительно снижен по сравнению с делящимися клетками. Резкие изменения в уровнях нескольких сотен мРНК в нейтрофилах человека происходят через 2 ч после взаимодействия с бактериями, но не отражаются на уровнях соответствующих мРНК, полученных через 1 ч, с некоторыми исключениями. Синтез IL-8 и экспрессия мРНК в нейтрофилах, стимулированных антителами к IgE, начинается через 3 ч после инициирующего воздействия [18, 19]. В качестве модели интегрин-зависимой адгезии нейтрофилов к тканям мы использовали адгезию к субстрату, покрытому фибриногеном. Прикрепление нейтрофилов к субстрату и сопутствующая секреция происходили и практически завершались в течение 20–25 мин [20]. Мы предполагаем, что проявившиеся за это время эффекты дексаметазона носят преимущественно негеномный характер.

Мы провели исследование действия дексаметазона на прикрепление нейтрофилов к субстрату, на морфологию прикрепленных клеток, а также на сопутствующую секрецию активных форм кислорода (АФК), оксида азота (NO), белков и свободных аминокислот. Продуцируемые нейтрофилами в процессе адгезии АФК [21–23] и NO [24] играют важную роль в развитии воспалительных процессов. Нейтрофилы содержат три типа секреторных гранул, различающихся по составу и назначению белков и пептидов. Различные сигнальные пути запускают секрецию гранул разных типов [20, 25, 26]. Секреция протеаз и порообразующих пептидов первичных гранул нейтрофилов может инициировать воспалительные процессы в тканях, а секреция металлопротеиназ четвертичных гранул может осуществлять реорганизацию внеклеточного матрикса, требующуюся для процессов инвазии и адгезии клеток.

Параллельные эксперименты проведены по изучению влияния дексаметазона на состав секреции свободных аминокислот. Ранее нами было показано, что адгезия нейтрофилов к субстрату стимулирует секрецию гидроксизина, но практически не влияет на секрецию других аминокислот [27, 28]. Роль гидроксизина, метаболита лизилгидроксилазы (LH 1, 2, 3 или проколлаген-лизин 2-оксоглутарат 5-диоксигеназы PLOD 1, 2, 3), в физиологии нейтрофилов не изучена. Способность к инвазии в ткани организма объединяет нейтрофилы с опухолевыми клетками. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что повышение экспрессии и активности лизилгидроксилазы связано со способностью опухолевых клеток мигрировать и образовывать метастазы при заболеваниях глиомами [29], раком легкого [30], карциномой эндометрия [31] и другими видами рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) без бикарбоната натрия и фенолового красного, фосфатно-солевой буфер Дульбекко (D-PBS) без CaCl₂, дексаметазон, форбол 12-миристанат 13-ацетат (PMA), ингибитор тиоловых протеаз E64 и фибриноген плазмы человека («Sigma-Aldrich», Германия); Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция); Coomassie Brilliant Blue G-250 («Serva», Германия); PMSF («MP Biomedical», США); трипановый синий

(«Honeywell Fluka», США); глутаровый альдегид («Ted Pella», США); трипсин («Promega», США); 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2 DA) («Merck KGaA», Германия); диацетат 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (Carboxy-H₂DCF-DA) («Thermo Fisher Scientific», США); растворители для аналитической хроматографии: элюент MCI Buffer L-8800-PH-1-4 и набор окрашивающих растворов нингидрина для Hitachi 29970501 («FUJIFILM Wako Chemicals GmbH», США).

Выделение нейтрофилов человека. Нейтрофилы получали из крови здоровых доноров, не получавших фармакологические препараты в течение двух недель до эксперимента. Метод получения нейтрофилов был описан ранее [23]. В качестве антикоагулянта использовался цитрат натрия. После осаждения эритроцитов 3%-ным раствором декстрана Т-500 нейтрофилы отделяли от богатой лейкоцитами плазмы центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077 мг/мл). После гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов нейтрофилы дважды промывали в PBS, суспендировали (10⁷ клеток на мл) в D-PBS, содержащем 1 мг/мл глюкозы, и хранили до экспериментов при комнатной температуре. Чистота суспензии нейтрофилов составляла 96–97%. Рутинный контроль гомогенности выделенных клеток осуществляли с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии на микроскопе Zeiss Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия), выявляя нейтрофилы по характерным сегментированным ядрам. Для оценки жизнеспособности выделенные нейтрофилы окрашивали красителем трипановым синим, который окрашивает поврежденные, но не проникает в жизнеспособные клетки. Нейтрофилы инкубировали 15 мин при 37 °С в 0,5 мМ растворе трипанового синего и отмывали PBS. Процент окрашенных клеток не превышал 1–2% (*n* = 3000).

Измерение количества прикрепленных нейтрофилов. Методика определения процента прикрепленных нейтрофилов основана на измерении абсорбции 2,3-диаминофеназина, продукта катализируемого миелопероксидазой окисления о-фенилендиамина дигидрохлорида (OPD) с помощью H₂O₂ [32]. Перед экспериментом 96-луночные культуральные планшеты («Greiner bio-one», Германия) инкубировали в течение 2 ч с раствором фибриногена (30 мг/мл) при комнатной температуре и промывали PBS. Нейтрофилы высевали в лунки, покрытые фибриногеном (2 × 10⁵ клеток на лунку), 96-луночного планшета в растворе HBSS, содержащем 10 мМ HEPES (рН 7,4).

Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. После удаления не прикрепившихся к субстрату или слабо прикрепившихся клеток двукратным промыванием теплым PBS в лунки добавляли по 0,1 мл 4 мМ H₂O₂ в пермеабилзирующем буфере (67 мМ Na₂HPO₄, 35 мМ лимонной кислоты, 0,1% (w/v) Triton X-100), содержащем 5,5 мМ OPD, на 5 мин. Реакцию останавливали равным объемом 1 М H₂SO₄. Поглощение на длине волны 490 нм измеряли с помощью устройства для чтения микропланшетов CLARIOstar («BMG Labtech», Германия). Количество прикрепившихся клеток определяли по калибровочной кривой.

Измерение внутриклеточной продукции АФК нейтрофилами. Количественную оценку влияния дексаметазона на накопление АФК в цитозоле нейтрофилов производили путем измерения интенсивности зеленой флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), продукта окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H₂DCF-DA). Нейтрофилы инкубировали с 5 мкМ карбокси-H₂DCF-DA в течение 60 мин при комнатной температуре, промывали PBS и хранили в D-PBS до использования. Затем нейтрофилы высевали в покрытые фибриногеном лунки 96-луночного планшета (4 × 10⁵ клеток на лунку) в HBSS, содержащем 10 мМ HEPES (рН 7,4), и инкубировали 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона или 5 нМ PMA. Интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания (488 и 525 нм соответственно) контролировали с помощью устройства CLARIOstar.

Количественная оценка продукции NO нейтрофилами. Продукция оксида азота нейтрофилами количественно оценивалась по интенсивности флуоресценции триазолофлуоресцеина (DAF-2T), продукта реакции DAF-2 с NO, как описано ранее [24]. Нейтрофилы инкубировали в течение 60 мин с 5 мкМ DAF-2 при комнатной температуре, промывали PBS и хранили в темноте в D-PBS до использования. Нагруженные DAF-2 нейтрофилы высевали в лунки, покрытые фибриногеном (4 × 10⁵ клеток на лунку), 96-луночного планшета, и инкубировали 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. Интенсивность флуоресценции DAF-2 (возбуждение/испускание – 488/525 нм) измеряли с помощью устройства CLARIOstar.

Метод сканирующей электронной микроскопии и количественная оценка действия дексаметазона на морфологию прикрепленных нейтрофилов. Сканирующую электронную микроскопию использовали для сравнения морфологии нейтрофилов, прикрепленных к покровным стеклам, покрытым фибриногеном, в контрольных условиях или в присутствии дексаметазона. Изолированные нейтрофилы помещали на покровные стекла, покрытые фибриногеном, на 25 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1–1 мкМ дексаметазона. Прикрепленные клетки фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом в HBSS, содержащем 10 мМ HEPES, 0,5 мМ PMSF в качестве ингибитора сериновых протеаз и 5 мМ ЭДТА в качестве ингибитора металлопротеиназ. Перед обезвоживанием клетки дополнительно фиксировали 1%-ной четырехокисью осмия в 0,1 М растворе какодилата натрия, содержащем 0,1 М сахарозы (рН 7,3). Для обезвоживания клетки проводили через ряд растворов ацетона (10–100%) и сушили в аппарате Бальцера в критической точке с жидким CO₂ в качестве переходной жидкости. После напыления золотом/палладием образцы исследовали при 15 кВ с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan S-2 («Cambridge Instrument Corporation», Великобритания).

Для количественной оценки влияния дексаметазона на морфологию нейтрофилов измеряли площадь, занимаемую прикрепленными клетками на субстрате, периметр и коэффициент поляризации клеток. Коэффициент поляризации рассчитывали как соотношение длинной и короткой осей клетки, если ее форму представить в виде эллипса [33]. Программу ImageJ-win64 использовали для измерения параметров клеток на изображениях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для каждой экспериментальной группы измеряли параметры 10–15 клеток.

Отбор внеклеточной среды для выделения и идентификации аминокислот и белков, секретированных нейтрофилами в процессе адгезии. Для этих экспериментов 6-луночные культуральные планшеты («Greiner bio-one») инкубировали в течение 2 ч с раствором фибриногена (5 мкг/мл) и промывали. Нейтрофилы высевали в каждую лунку (3×10^6 клеток на лунку) и инкубировали в течение 25 мин при 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂ в контрольных условиях (в HBSS, содержащем 10 мМ HEPES при рН 7,35) или в присутствии дексаметазона (0,1–10 мкМ). После этого отбирали образцы внеклеточной среды и добавляли смесь инги-

биторов (5 мМ ЭДТА, ингибитор металлопротеиназ; 200 мкМ PMSF, ингибитор сериновых протеиназ; 10 мкМ E64, ингибитор цистеиновых протеиназ, 0,025% азида натрия, ингибитор миелопероксидазы). Затем образцы внеклеточной среды подвергали центрифугированию (5 мин при 400 g) для удаления неприкрепленных клеток.

Аминокислотный анализ и подготовка образцов. Для аминокислотного анализа образцы внеклеточной среды из трех одинаковых лунок объединяли и концентрировали на Centrivar Concentrator («Labconco», США). Затем белки осаждали сульфосалициловой кислотой (4,4%) и удаляли центрифугированием при 18 000 g. Супернатанты дополнительно центрифугировали через ультрафильтры Vivaspin 500 Membrane 3000 PES MWCO («Sartorius», Германия). Аминокислоты разделяли и количественно определяли с использованием анализатора аминокислот L-8800 («Hitachi», Япония). Процедуры проводили в стандартном режиме, согласно инструкции производителя («Hitachi High-Technologies Corporation», Япония, 1998 г.). Концентрированные и не содержащие белков образцы внеклеточной среды разделяли на ионообменной колонке 2622SC (PH) («Hitachi», P/N 855-4506; 4,6 × 60 мм) с использованием ступенчатого градиента четырех натрий-ацетатных буферов при скорости потока 0,4 мл/мин при 57 °С. Для постколонной дериватизации использовали смесь равных объемов нингидринового буфера R2 и раствора нингидрина R1 («Wako Pure Chemical Industries», Япония; P/N 298-69601). Образование окрашенных продуктов оценивали путем измерения поглощения при 570 нм встроенным детектором анализатора аминокислот. Данные обрабатывали с помощью программы MultiChrom для Windows («Амперсанд», Москва, Россия).

Выделение и разделение белков, секретированных нейтрофилами, при адгезии к фибриногену. Для выделения белков образцы внеклеточной среды из шести одинаковых лунок объединяли и смешивали с равным объемом смеси (хлороформ/метанол = 2/1, (v/v)). После смешивания с помощью Vortex и шейкера при 4 °С в течение 30 мин полученную смесь подвергали центрифугированию при 11 000 g в течение 20 мин для разделения фаз. Хлороформенную фазу собирали и после выпаривания растворителя подвергали электрофорезу. Наша предыдущая работа показала, что хлороформенная фаза содержит почти все белки внеклеточной среды, а водно-метанольная фаза содержит только следовые коли-

чества белков. Белки хлороформенной фазы разделяли одномерным электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) с использованием оборудования MiniPROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США) и 15%-ного полиакриламидного геля в невосстанавливающих условиях, как было опубликовано ранее [20]. Белковые полосы в геле окрашивали 0,22%-ным Coomassie Brilliant Blue G-250.

Идентификация белков методом масс-спектрометрии. Из каждой окрашенной Coomassie Brilliant Blue белковой полосы вырезали кусочки геля, обезвоживали, сушили на воздухе и проводили трипсиновый гидролиз прямо в геле, как описано ранее [20]. Образовавшиеся в результате гидролиза пептиды экстрагировали 0,5%-ной трифторуксусной кислотой и подвергали масс-спектрометрическому анализу. Аликвоты образцов смешивали на стальной мишени с 2,5-дигидроксибензойной кислотой (30 мг/мл в 30%-ном ацетонитриле, в 0,5%-ной трифторуксусной кислоте) и высушивали при комнатной температуре. Белки MALDI-MS идентифицировали с использованием масс-спектрометра MALDI-ToF-ToF Ultraflextreme («Bruker», Германия), как описано ранее [20]. Молекулярные ионы $[MH]^+$ измеряли в отражательном режиме. Точность измерения моноизотопного массового пика не превышала 30 ppm. Программное обеспечение Mascot 2.5.01 (<http://www.matrixscience.com>, по состоянию на 3 января 2021 г.) и база данных белков млекопитающих Swissprot использовались для поиска пептидных «отпечатков пальцев». Совпадения белков считались значимыми ($p < 0,05$), если оценка была > 68 .

Статистический анализ. Все эксперименты по изучению прикрепления нейтрофилов и морфологии прикрепленных клеток, количественной оценке образования АФК и NO, а также оценке аминокислотного и белкового состава секрета нейтрофилов повторяли трехкратно с использованием крови разных доноров. Для сравнения средних значений во всех случаях, кроме исследования секрета аминокислот, использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Количественные характеристики профиля секрета аминокислот описывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с тестом Тьюки (two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test). Статистическую обработку и построение графиков количественных данных осуществляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дексаметазон не влияет на прикрепление нейтрофилов к фибриногену и на морфологию прикрепленных клеток. Используя сканирующую электронную микроскопию, мы сравнили морфологию нейтрофилов, которые прикреплялись к субстратам, покрытым фибриногеном, в контрольных условиях или в присутствии дексаметазона (рис. 1, а–д). Дексаметазон в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ не влиял на морфологию прикрепленных нейтрофилов (рис. 1, а). Определение средней площади, занимаемой клетками на субстрате, среднего периметра и среднего коэффициента поляризации клеток было проведено с помощью программы ImageJ-win64 на микрофотографиях клеток. Значимой разницы в значениях этих параметров между контрольными клетками и клетками, прикрепившимися к фибриногену в присутствии дексаметазона, не обнаружено (рис. 1, б–г).

Мы также изучали влияние дексаметазона на прикрепление нейтрофилов к субстрату. После прикрепления нейтрофилов к фибриногену и удаления не прикрепившихся к субстрату клеток количество прочно прикрепленных клеток определяли по интенсивности поглощения 2,3-диаминофеназина, окрашенного продукта катализируемого миелопероксидазой окисления о-фенилендиамина дигидрохлорида. Присутствие дексаметазона в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ не влияло на прикрепление нейтрофилов к фибриногену в наших экспериментах (рис. 1, д).

Продукция активных форм кислорода нейтрофилами при адгезии к фибриногену не изменялась в присутствии дексаметазона. Интегрин-зависимая адгезия к субстрату сама по себе, в отсутствие других стимулов, инициирует продукцию АФК нейтрофилами [21, 22]. Результаты настоящей статьи демонстрируют, что адгезия нейтрофилов к субстрату, покрытому фибриногеном, в контрольных условиях также сопровождается продукцией АФК. При этом присутствие дексаметазона в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ не влияет на продукцию АФК нейтрофилами, по результатам измерения флуоресценции через 30 мин после начала процесса адгезии (рис. 2, а).

Следует отметить, что адгезия сама по себе является довольно слабым индуктором генерации АФК. Так, добавление даже незначительного количества классического стимулятора NADPH-оксидазы, PMA, уже через 30 мин обеспечивало пятикратное превышение интенсивности флуоресценции в сравне-

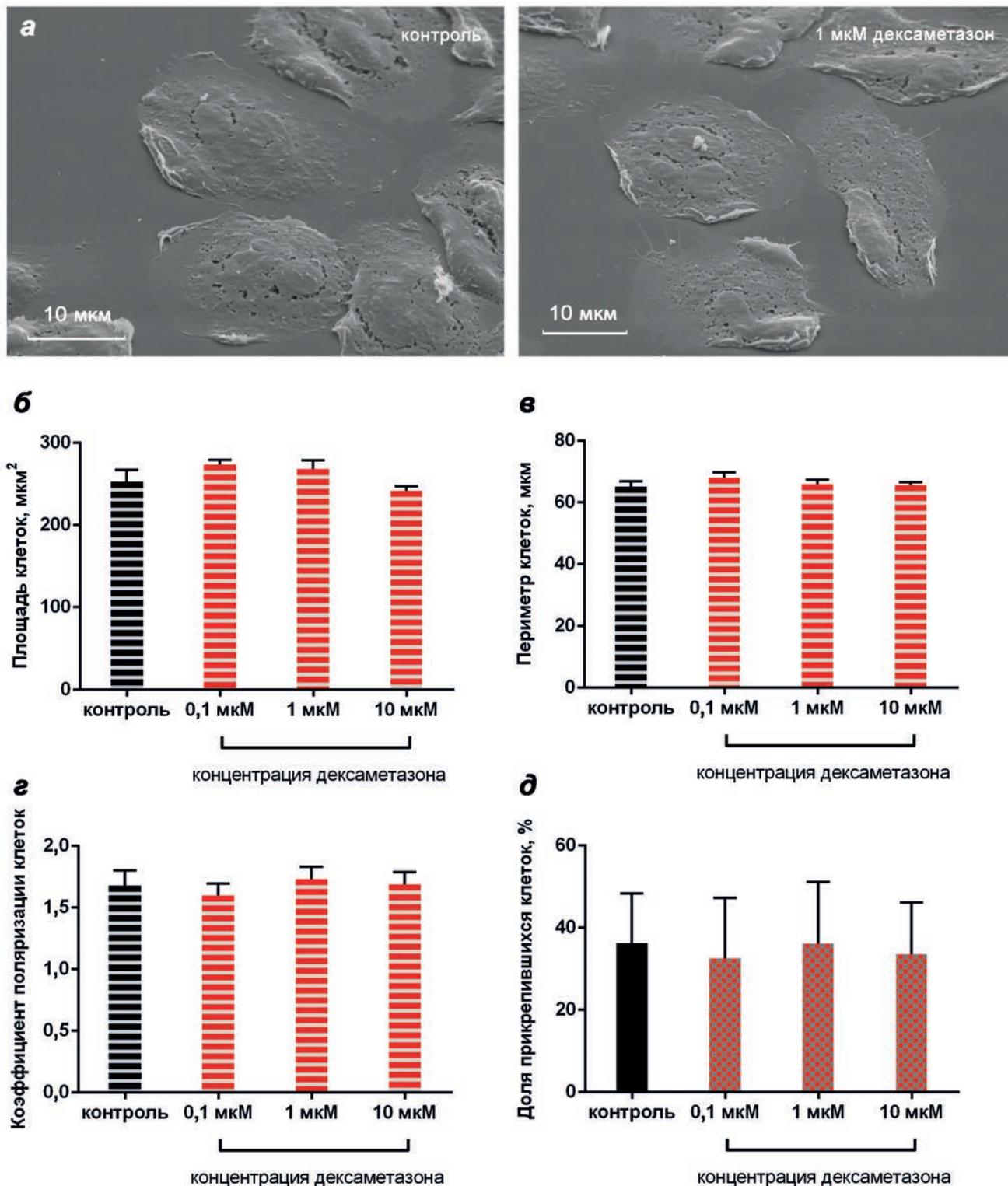


Рис. 1. Влияние дексаметазона на прикрепление нейтрофилов к субстрату и морфологию прикрепленных клеток. *а* – Изображения нейтрофилов, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии. Нейтрофилы прикреплялись к субстратам, покрытым фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 1 мкМ дексаметазона. На рисунке представлены типичные изображения нейтрофилов, наблюдавшиеся в трех независимых экспериментах. *б* – Средние значения площади, занимаемой нейтрофилами на субстрате, *в* – периметра и *г* – коэффициента поляризации клеток, определенные с помощью программы ImageJ-win64 на микроскопических изображениях. *д* – Доля прочно прикрепленных нейтрофилов в процентах от общего числа клеток, которые прикреплялись к субстрату, покрытому фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. Представлены данные (среднее значение \pm стандартное отклонение) трех независимых экспериментов с кровью разных доноров (*б–д*)

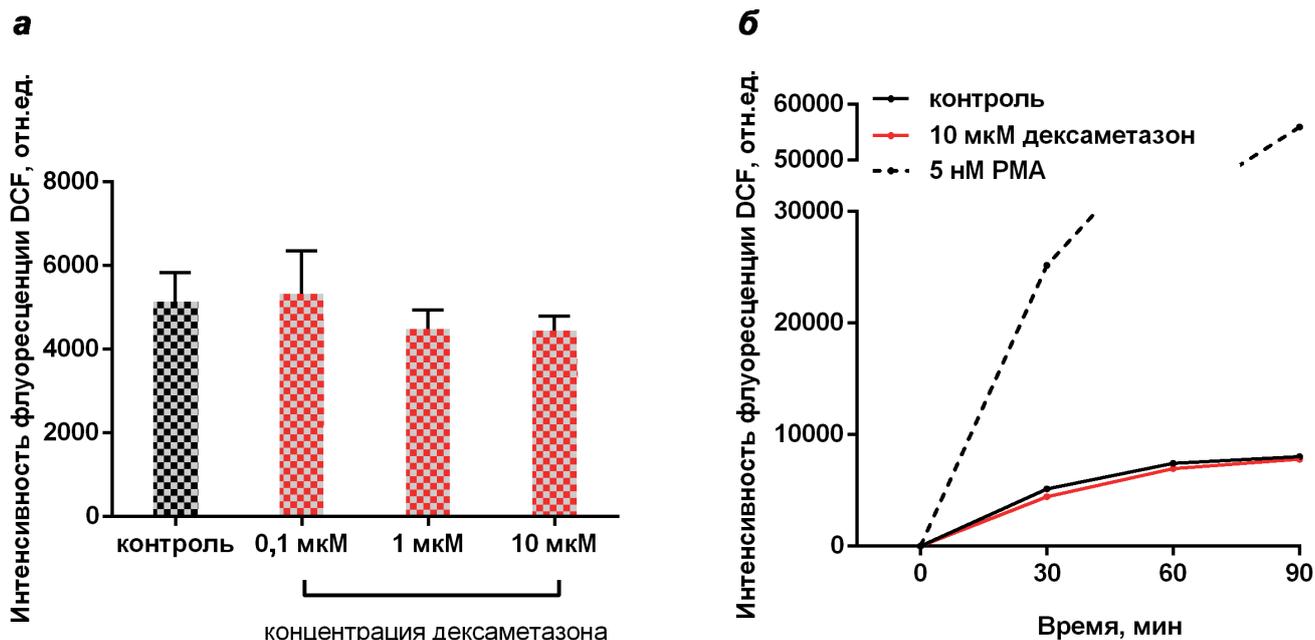


Рис. 2. Влияние дексаметазона на продукцию АФК нейтрофилами при адгезии к фибриногену. *а* – Интенсивность флуоресценции DCF, измеренная через 30 мин после начала инкубации нагруженных $H_2DCF-DA$ нейтрофилов, в покрытых фибриногеном 96-луночных планшетах при $37^\circ C$ в атмосфере $5\% CO_2$ в контрольных условиях и в присутствии 0,1; 1 и 10 мкМ дексаметазона. Данные представляют интенсивность флуоресценции DCF (среднее значение \pm стандартное отклонение) по результатам трех независимых экспериментов с кровью разных доноров. *б* – Типичные кинетические кривые флуоресценции DCF, зарегистрированные в процессе адгезии контрольных нейтрофилов в присутствии 10 мкМ дексаметазона или 5 нМ PMA

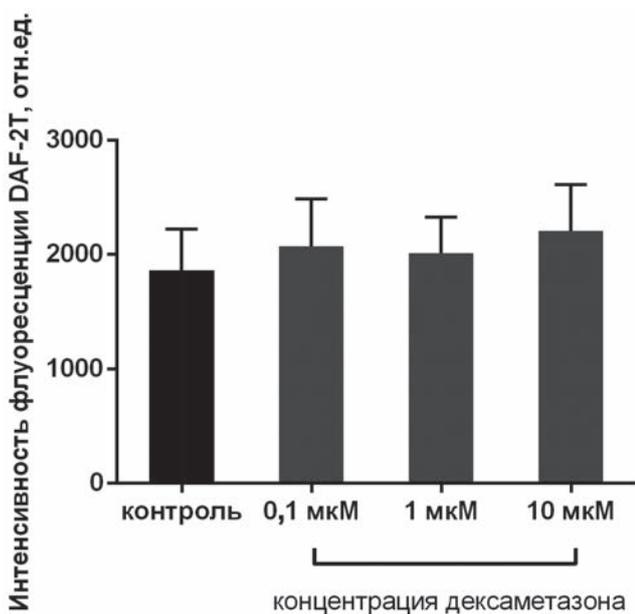


Рис. 3. Влияние дексаметазона на продукцию NO нейтрофилами при адгезии к фибриногену. Нагруженные DAF-2 нейтрофилы (4×10^5 клеток на мл) высевали в лунки, покрытые фибриногеном, на 30 мин при $37^\circ C$ в атмосфере $5\% CO_2$ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. Представлены значения интенсивности флуоресценции DAF-2T (среднее значение \pm стандартное отклонение; возбуждение/испускание – 488/525 нм), полученные в трех независимых экспериментах, выполненных на крови разных доноров

нии с контрольными образцами, стремительно нарастая во времени (рис. 2, б).

Производство NO нейтрофилами при адгезии не изменяется в присутствии дексаметазона. NO сам по себе и во взаимодействии с O_2 может играть важную роль в окислительных процессах и развитии воспаления. Данные о влиянии дексаметазона на продукцию NO весьма противоречивы [34–36]. Мы изучали влияние дексаметазона на высвобождение NO нейтрофилами при адгезии. Наши данные показали, что дексаметазон в концентрации 0,1–10 мкМ не влиял на продукцию NO нейтрофилами в течение 30 мин инкубации над субстратами, покрытыми фибриногеном (рис. 3).

Влияние дексаметазона на секрецию свободных аминокислот нейтрофилами в процессе адгезии. Наша предыдущая работа показала, что нейтрофилы имеют стабильный профиль секреции свободных аминокислот. Адгезия к субстрату сильно и избирательно влияет на секрецию гидроксизина, но секреция других аминокислот не зависела от адгезии клеток [27, 28].

Дексаметазон в концентрации 0,1–1 мкМ статистически значимо стимулировал высвобождение гидроксизина, но не влиял на секрецию других свободных аминокислот (рис. 4). Для исключения возможности появ-

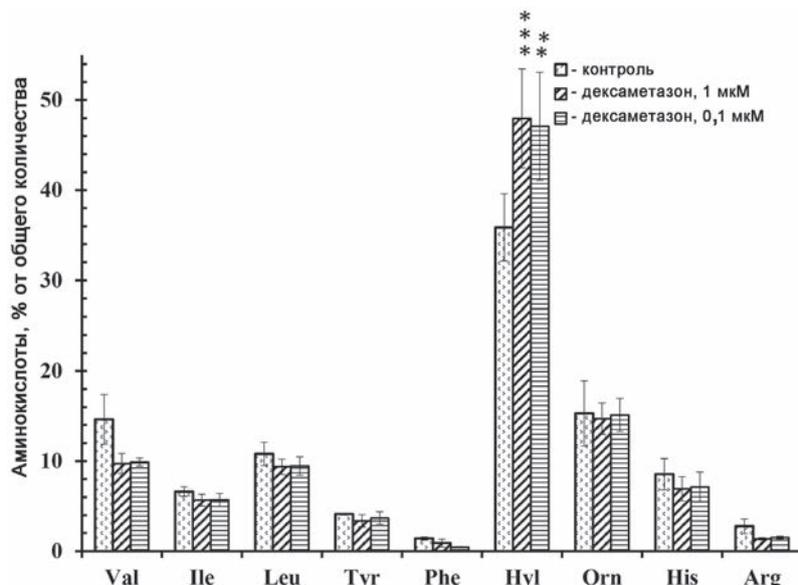


Рис. 4. Влияние дексаметазона на состав секреции свободных аминокислот, секретируемых нейтрофилами при адгезии к фибриногену. Нейтрофилы прикрепляли к субстратам, покрытым фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 0,1 или 1 мкМ дексаметазона. Количество аминокислот представлено в процентах от общего содержания найденных свободных аминокислот (среднее значение \pm стандартное отклонение). Аминокислотные профили построены по результатам трех независимых экспериментов, проделанных на крови разных доноров. * Достоверные различия по сравнению со значением для той же аминокислоты в контрольных клетках (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0006$)

ления аминокислот во внеклеточной среде в результате разрушения клеток нейтрофилы после эксперимента и забора внеклеточной среды окрашивали трипановым синим. Процент мертвых (окрашенных) клеток не превышал 2% ни в одном образце.

Влияние дексаметазона на состав секреции белков нейтрофилами при адгезии к фибриногену. Интегрин-зависимая адгезия нейтрофилов сопровождается секрецией цитозольных белков и белков из внутриклеточных гранул трех типов, секреторных пузырьков и из цитоплазмы. Поскольку секреция белков из этих источников запускается разными стимулами, белковый состав секрета существенно зависит от условий [20]. После завершения адгезии нейтрофилов к субстрату (25 мин) отбирали внеклеточную среду, концентрировали и разделяли белки электрофорезом в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Окрашивание гелей серебром выявило многочисленные полосы, указывающие на то, что нейтрофилы выделяют большое количество белков при адгезии (данные не представлены). Чтобы иметь возможность идентифицировать белки с помощью масс-спектрометрии, гели в этой работе были окрашены красителем Coomassie Brilliant Blue, который выявляет только ограниченное количество основных белковых полос. Однако этот метод позволил нам различить профили белков, характерные для секреции нейтрофилов

во время адгезии в контрольных условиях и в присутствии дексаметазона.

Основными белками, секретируемыми нейтрофилами при адгезии к фибриногену в контрольных условиях и статистически значимо идентифицированными с помощью масс-спектрометрии, были лактоферрин (ЛФ), липокалин нейтрофилов, ассоциированный с желатиназой (NGAL), и лизозим – белки, преимущественно локализованные в специфических гранулах; сывороточный альбумин, локализованный в секреторных пузырьках; цитозольные белки S100A8 и S100A9 (рис. 5). Для исключения возможности появления белков во внеклеточной среде в результате гибели клеток нейтрофилы после опытов окрашивали трипановым синим. Процент погибших нейтрофилов не превышал 1–2%.

Белковый профиль секреции нейтрофилов при адгезии к фибриногену в присутствии дексаметазона включал, помимо белков, секретируемых контрольными клетками, матриксную металлопротеиназу-9, локализованную преимущественно в третичных гранулах, и цитозольный белок кальпротектин (рис. 5, таблица). Следует отметить, что дексаметазон не стимулировал высвобождение компонент первичных гранул, таких как сериновые протеазы и порообразующие пептиды, которые способны инициировать воспалительные процессы в тканях хозяина.

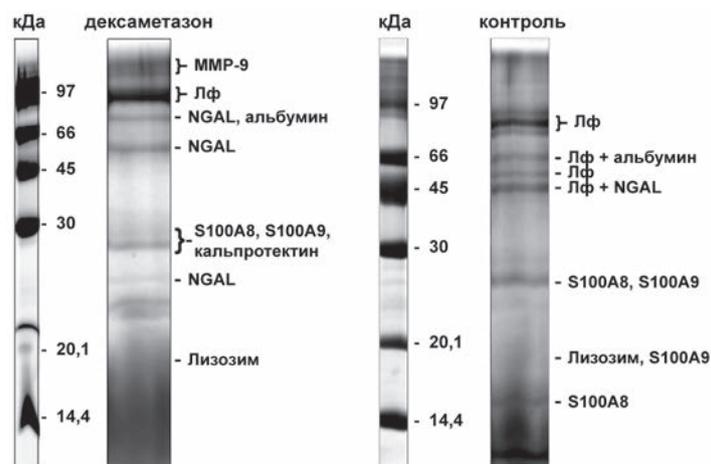


Рис. 5. Разделение SDS-PAGE белков, секретируемых нейтрофилами при адгезии к фибриногену в присутствии дексаметазона. Нейтрофилы человека инкубировали над субстратами, покрытыми фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 1 мкМ дексаметазона. Образцы внеклеточной среды собирали, белки экстрагировали и разделяли с помощью 15%-ного SDS-PAGE. Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue. Представлены репрезентативные гели из трех аналогичных экспериментов, выполненных на крови разных доноров

Список белков, секретируемых нейтрофилами при адгезии к фибриногену

Название белка	Название белка		Пептиды, совпадающие/ общее число	Покрытие, %	Параметр достоверности (score)
	контроль	дексаметазон			
MMP9_HUMAN		MMP-9	14/50	22	97
TRFL_HUMAN	+	ЛФ	33/59	50	300
NGAL_HUMAN	+	NGAL	9/21	62	138
ALBU_HUMAN	+	альбумин	15/18	38	95
LYSC_HUMAN	+	лизозим	8/14	53	115
S10A9_HUMAN	+	S100-A9	7/24	60	96
S10A8_HUMAN	+	S100-A8	6/24	45	75
S10A8/A9_HUMAN		кальпротектин	7/24	61	101

Примечание. Нейтрофилы прикрепляли к фибриногену в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 1 мкМ дексаметазона. Белки экстрагировали из внеклеточной среды, разделяли с помощью SDS-PAGE и идентифицировали с помощью масс-спектрометрии. Данные масс-спектрометрии для идентифицированных белков были взяты из экспериментов с дексаметазоном. Сходные белки, идентифицированные во внеклеточной среде контрольных клеток, отмечены (+). Идентификация белка считалась достоверной ($p < 0,05$), если оценка была > 68 . Список включает белки, идентифицированные в трех аналогичных экспериментах, выполненных на крови разных доноров. MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; ЛФ – лактоферрин; NGAL – липокалин нейтрофилов, ассоциированный с желатиназой; S100A8 и S100A9 – цитозольные белки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дексаметазон, синтетический глюкокортикоидный гормон с иммунодепрессивным и противовоспалительным действием, используется при лечении аутоиммунных и многих других заболеваний, включая тяжелые формы COVID-19. Считается, что глюкокортикоиды проходят через клеточные мембраны

путем пассивной диффузии и соединяются в цитоплазме с внутриклеточными глюкокортикоидными рецепторами. Глюкокортикоидные рецепторы после связывания с лигандом перемещаются в ядро клетки, где они взаимодействуют с факторами транскрипции, тем самым вызывая геномные эффекты, которые изменяют экспрессию белка. Помимо геномных эффектов, глюкокортикоиды могут быстро

изменять свойства мембран, тем самым оказывая негеномное действие на клеточные процессы [16, 35, 37–39]. Острые негеномные эффекты дексаметазона на передачу сигналов и ионный транспорт изучались на эпителиальных клетках дыхательных путей. Дексаметазон быстро стимулировал обменную активность Na^+/H^+ -антипорта, но вызывал снижение внутриклеточного Ca^{2+} и ингибировал секрецию Cl^- и K^+ мембранных каналов [15, 40].

Результаты наших экспериментов демонстрируют, что краткосрочное действие (25–30 мин) дексаметазона не оказывает влияния на прикрепление нейтрофилов к покрытому фибриногеном субстрату и на продукцию АФК, сопровождающую этот процесс (рис. 1, 2). Наши результаты подтверждают ранее опубликованные данные об отсутствии влияния дексаметазона на продукцию нейтрофилами супероксид-анион-радикалов (O_2^-), измеряемую по восстановлению цитохрома *c* [41]. Более того, в экспериментах с периферическими нейтрофилами крыс наблюдалось быстрое негеномное ингибирующее действие дексаметазона на индуцированное РМА образование O_2^- [42].

Дексаметазон также не влиял на продукцию нейтрофилами NO в процессе адгезии (рис. 3). Опубликованные данные показывают, что дексаметазон в концентрации 0,1 мкМ активировал эндотелиальную NO -синтазу по быстрому нетранскрипционному пути, в течение 10 мин увеличивая выброс NO в 2,5–3 раза [34]. В нейтрофилах экспрессируется NO -синтаза нейронального типа [43]. Хотя обе изоформы являются конститутивными и Ca^{2+} -зависимыми, они регулируются по-разному [44]. Данные о влиянии дексаметазона на активность нейрональной изоформы противоречивы. Показано, что дексаметазон вызывает быстрое негеномное увеличение на 20–50% продукции NO , инициируемой внеклеточным АТФ в нейронах спирального ганглия улитки [35]. Напротив, вклад дексаметазона в обезболивающий эффект блокады седалищного нерва у мышей с моделью послеоперационной боли был связан с подавлением синтеза NO [36]. Следует отметить, что дексаметазон вызывает быстрое негеномное снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что может способствовать подавлению продукции NO Ca^{2+} -зависимыми изоформами NO -синтазы [45].

Наши результаты демонстрируют, что дексаметазон вызывает статистически достоверное увеличение высвобождения гидроксилизина нейтрофилами в процессе адгезии и стимулирует секрецию ММР-9 в дополнение

к белкам, секретируемым в контрольных условиях (рис. 4 и 5, таблица). Ранее нами было показано, что адгезия нейтрофилов к субстрату значительно и селективно стимулирует высвобождение гидроксилизина, но не влияет на секрецию других аминокислот [27, 28]. Высвобождение гидроксилизина обеспечивается лизилгидроксилазой (ЛГ), поскольку ингибируется миноксидилом, ингибитором ЛГ [27]. ЛГ осуществляет посттрансляционную модификацию остатков лизина в молекуле коллагена в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме клеток, модулируя таким образом организацию внеклеточного матрикса [46]. В опухолевых клетках ЛГ может также секретироваться во внеклеточное пространство и модифицировать там коллаген и другие белки [47–49]. Согласно многочисленным данным, повышение экспрессии и активности ЛГ является мощным промотором метастазирования опухолей и потенциальной мишенью для лечения рака [29–31].

Ранее мы показали, что высвобождение гидроксилизина подавляется доксициклином, ингибитором матриксных металлопротеиназ. Это указывает на тесное взаимодействие между ЛГ и металлопротеиназами в процессе модификации внеклеточной среды во время адгезии нейтрофилов [27]. Металлопротеиназы играют важную роль в миграции нейтрофилов и их инвазии в ткани [50–54]. Ингибирование активности ММР-9 доксициклином предотвращает инфильтрацию нейтрофилов в легочную ткань и подавляет воспаление при заражении *Streptococcus pneumoniae* при воздействии липополисахаридами (LPS) или токсичными гербицидами [55–57]. ММР-2 и ММР-9 обеспечивают проникновение лейкемических клеток в центральную нервную систему, разрушая гематоэнцефалический барьер [58]. Стимуляция секреции ММР-9 нейтрофилами при заражении микобактериями туберкулеза способствует разрушению коллагена типа 4, являющегося основой гематоэнцефалического барьера [59]. Дефицит ММР-9 сам по себе подавляет инвазию лейкоцитов в печень и защищает от реперфузии после ишемии [60].

Механизм взаимодействия ЛГ и металлопротеиназ при адгезии и инвазии нейтрофилов не изучен, но некоторые данные получены для опухолевых клеток. ММР-9 представляет собой секретируемый фермент, который может быть локализован на поверхности клетки. Прикрепление ММР-9 к клеточной поверхности может защитить фермент от естественных ингибиторов и способствовать реорганизации внеклеточного матрикса для обеспечения

клеточной инвазии. Одной из молекул, ответственных за иммобилизацию MMP-9 на поверхности фибробластов в строме опухоли, является молекула ЛГ (LN3 или PLOD3). Взаимодействие между MMP-9 и LN3 запускает активацию TGF- β и дифференцировку фибробластов в миофибробласты, которые усиливают прогрессирование опухоли за счет ремоделирования стромы [61]. CD44, рецептор гиалуроновой кислоты, также может связывать MMP-9 на поверхности кератиноцитов и некоторых опухолевых клеток [62–64]. Предполагается, что локализованная на клеточной поверхности MMP-9 может протеолитически активировать TGF- β и способствовать инвазии опухоли [65].

Взаимодействие ЛГ и MMP-9 в опухолевых клетках и нейтрофилах требует интактного актинового цитоскелета. Цитохалазин D и все воздействия, так или иначе нарушающие целостность актинового цитоскелета, подавляли высвобождение гидроксизина [27] и нарушали секрецию MMP-9 при адгезии нейтрофилов [25]. Ингибирование полимеризации актина алендронатом или цитохалазином D эффективно блокировало образование комплекса CD44/MMP-9 и подавляло секрецию активной формы MMP-9 и миграцию опухолевых клеток [66, 67].

Терапевтический эффект дексаметазона может реализовываться через изменение секреции нейтрофилов, приводящее к реорганизации внеклеточного матрикса, способствующей инвазии нейтрофилов. Согласно механистической модели, у пациентов с тяжелым течением заболевания COVID-19 «брадикининовый шторм» вызывает утечку жидкости в легкие.

Предполагается, что избыток жидкости в сочетании с избытком гиалуроновой кислоты в легких пациентов приводит к образованию желеобразных структур, препятствующих поглощению кислорода и выделению углекислого газа [68]. Мы предполагаем, что индуцированная дексаметазоном активация ЛГ и секреция MMP-9 и их взаимодействие с CD44, рецептором гиалуроновой кислоты, могут нарушать образование геля и нормализовать газообмен в легких пациентов. Это предположение согласуется с тем фактом, что дексаметазон улучшает выживаемость пациентов с тяжелым течением COVID-19, получающих кислород или искусственную вентиляцию легких из-за затрудненного дыхания. У остальных пациентов препарат был неэффективен.

Вклад авторов. С.И. Галкина, Е.А. Голенкина, Г.Ф. Судьина – концепция и написание статьи; С.И. Галкина, Е.А. Голенкина, Н.И. Федорова, А.Л. Ксенофонтов, М.В. Серебрякова, В.И. Стадничук, Л.А. Баратова, Г.Ф. Судьина – проведение экспериментов, обработка и обсуждение результатов, оформление статьи. Г.Ф. Судьина, Л.А. Баратова – обеспечение ресурсов для выполнения экспериментов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа с нейтрофилами человека поддержана Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Заявка № 6-ч ред. 3 одобрена на заседании Комиссии по биоэтике № 131-д 31 мая 2021 г. Все доноры дали информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schofield, Z. V., Woodruff, T. M., Halai, R., Wu, M. C., and Cooper, M. A. (2013) Neutrophils – a key component of ischemia reperfusion injury, *Shock*, **40**, 463-470, doi: 10.1097/SHK.000000000000044.
2. Patel, N. (2009) Targeting leukostasis for the treatment of early diabetic retinopathy, *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*, **9**, 222-229, doi: 10.2174/187152909789007052.
3. Liu, W., Cronin, C. G., Cao, Z., Wang, C., Ruan, J., Pulikkot, S., Hall, A., Sun, H., Groisman, A., Chen, Y., Vella, A. T., Hu, L., Liang, B. T., and Fan, Z. (2022) Nexinhib20 inhibits neutrophil adhesion and β_2 integrin activation by antagonizing Rac-1-guanosine 5'-triphosphate interaction, *J. Immunol.*, **209**, 1574-1585, doi: 10.4049/jimmunol.2101112.
4. Giacalone, V. D., Margaroli, C., Mall, M. A., and Tirouvanziam, R. (2020) Neutrophil adaptations upon recruitment to the lung: new concepts and implications for homeostasis and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 851, doi: 10.3390/ijms21030851.
5. Laval, J., Ralhan, A., and Hartl, D. (2016) Neutrophils in cystic fibrosis, *Biol. Chem.*, **397**, 485-496, doi: 10.1515/hsz-2015-0271.
6. Russell, D. W., Gaggar, A., and Solomon, G. M. (2016) Neutrophil fates in bronchiectasis and alpha-1 antitrypsin deficiency, *Ann. Am. Thoracic Soc.*, **13**, S123-S129, doi: 10.1513/AnnalsATS.201512-805KV.
7. Chiang, C. C., Korinek, M., Cheng, W. J., and Hwang, T. L. (2020) Targeting neutrophils to treat acute respiratory distress syndrome in coronavirus

- disease, *Front. Pharmacol.*, **11**, 572009, doi: 10.3389/fphar.2020.572009.
8. Meizlish, M. L., Pine, A. B., Bishai, J. D., Goshua, G., Nadelmann, E. R., Simonov, M., Chang, C. H., Zhang, H., Shallow, M., Bahel, P., Owusu, K., Yamamoto, Y., Arora, T., Atri, D. S., Patel, A., Gbyli, R., Kwan, J., Won, C. H., Dela Cruz, C., Price, C., et al. (2021) A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19, *Blood Adv.*, **5**, 1164-1177, doi: 10.1182/bloodadvances.2020003568.
 9. Ahmed, M. H., and Hassan, A. (2020) Dexamethasone for the treatment of coronavirus disease (COVID-19): a review, *SN Comprehensive Clin. Med.*, **2**, 2637-2646, doi: 10.1007/s42399-020-00610-8.
 10. Nhean, S., Varela, M. E., Nguyen, Y. N., Juarez, A., Huynh, T., Udeh, D., and Tseng, A. L. (2023) COVID-19: a review of potential treatments (corticosteroids, remdesivir, tocilizumab, bamlanivimab/etesevimab, and casirivimab/imdevimab) and pharmacological considerations, *J. Pharm. Pract.*, **36**, 407-417, doi: 10.1177/08971900211048139.
 11. Hong, S., Wang, H., Li, S., Liu, J., and Qiao, L. (2023) A systematic review and meta-analysis of glucocorticoids treatment in severe COVID-19: methylprednisolone versus dexamethasone, *BMC Infect. Diseases*, **23**, 290, doi: 10.1186/s12879-023-08280-2.
 12. Mohammed, M. A. (2023) Fighting cytokine storm and immunomodulatory deficiency: by using natural products therapy up to now, *Front. Pharmacol.*, **14**, 1111329, doi: 10.3389/fphar.2023.1111329.
 13. Hafkamp, F. M. J., Mol, S., Waque, I., and De Jong, E. C. (2022) Dexamethasone, but not vitamin D or A, dampens the inflammatory neutrophil response to protect at-risk COVID-19 patients, *Immune Netw.*, **22**, e36, doi: 10.4110/in.2022.22.e36.
 14. Sinha, S., Rosin, N. L., Arora, R., Labit, E., Jaffer, A., Cao, L., Farias, R., Nguyen, A. P., de Almeida, L. G. N., Dufour, A., Bromley, A., McDonald, B., Gillrie, M. R., Fritzier, M. J., Yipp, B. G., and Biernaskie, J. (2022) Dexamethasone modulates immature neutrophils and interferon programming in severe COVID-19, *Nat. Med.*, **28**, 201-211, doi: 10.1038/s41591-021-01576-3.
 15. Urbach, V., Verriere, V., Grumbach, Y., Bousquet, J., and Harvey, B. J. (2006) Rapid anti-secretory effects of glucocorticoids in human airway epithelium, *Steroids*, **71**, 323-328, doi: 10.1016/j.steroids.2005.09.014.
 16. Panettieri, R. A., Schaafsma, D., Amrani, Y., Koziol-White, C., Ostrom, R., and Tliba, O. (2019) Non-genomic effects of glucocorticoids: an updated view, *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**, 38-49, doi: 10.1016/j.tips.2018.11.002.
 17. Ronchetti, S., Ricci, E., Migliorati, G., Gentili, M., and Riccardi, C. (2018) How glucocorticoids affect the neutrophil life, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 4090, doi: 10.3390/ijms19124090.
 18. Subrahmanyam, Y. V., Yamaga, S., Prashar, Y., Lee, H. H., Hoe, N. P., Kluger, Y., Gerstein, M., Goguen, J. D., Newburger, P. E., and Weissman, S. M. (2001) RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria, *Blood*, **97**, 2457-2468, doi: 10.1182/blood.v97.8.2457.
 19. Monteseirin, J., Chacon, P., Vega, A., El Bekay, R., Alvarez, M., Alba, G., Conde, M., Jimenez, J., Asturias, J. A., Martinez, A., Conde, J., Pintado, E., Bedoya, F. J., and Sobrino, F. (2004) Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation, *J. Leukoc. Biol.*, **76**, 692-700, doi: 10.1189/jlb.0903441.
 20. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Romanova, J. M., Golyshev, S. A., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., Sud'ina, G. F., and Klein, T. (2012) Proteome analysis identified human neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes, membrane tethers) as bactericide trafficking, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1705-1714, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.06.016.
 21. Menegazzi, R., Busetto, S., Decleva, E., Cramer, R., Dri, P., and Patriarca, P. (1999) Triggering of chloride ion efflux from human neutrophils as a novel function of leukocyte beta 2 integrins: relationship with spreading and activation of the respiratory burst, *J. Immunol.*, **162**, 423-434, doi: 10.4049/jimmunol.162.1.423.
 22. Umanskiy, K., Robinson, C., Cave, C., Williams, M. A., Lentsch, A. B., Cuschieri, J., and Solomkin, J. S. (2003) NADPH oxidase activation in fibronectin adherent human neutrophils: A potential role for beta1 integrin ligation, *Surgery*, **134**, 378-383, doi: 10.1067/msy.2003.253.
 23. Galkina, S. I., Golenkina, E. A., Serebryakova, M. V., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Stadnichuk, V. I., and Sud'ina, G. F. (2022) Ivermectin affects neutrophil-induced inflammation through inhibition of hydroxylysine but stimulation of cathepsin G and phenylalanine secretion, *Biomedicines*, **10**, 3284, doi: 10.3390/biomedicines10123284.
 24. Golenkina, E. A., Galkina, S. I., Viryasova, G. M., and Sud'ina, G. F. (2023) The pro-oxidant effect of class A CpG ODNs on human neutrophils includes both non-specific stimulation of ROS production and structurally determined induction of NO synthesis, *Oxygen*, **3**, 20-31, doi: 10.3390/oxygen3010002.
 25. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Arifulin, E. A., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2017) Mold alkaloid cytochalasin D modifies the morphology and secretion of fMLP-, LPS-, or PMA-stimulated neutrophils upon adhesion to fibronectin, *Mediat. Inflamm.*, **2017**, 4308684, doi: 10.1155/2017/4308684.
 26. Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Serebryakova, M. V., Stadnichuk, V. I., Gaponova, T. V., Baratova, L. A., Sud'ina, G. F., and Galkina, S. I. (2018) Neutrophils release metalloproteinases during adhesion

- in the presence of insulin, but cathepsin G in the presence of glucagon, *Mediat. Inflamm.*, **2018**, 1574928, doi: 10.1155/2018/1574928.
27. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Serebryakova, M. V., Golenkina, E. A., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2021) Neutrophil adhesion and the release of the free amino acid hydroxylysine, *Cells*, **10**, 563, doi: 10.3390/cells10030563.
 28. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2019) Neutrophils as a source of branched-chain, aromatic and positively charged free amino acids, *Cell Adhes. Migrat.*, **13**, 98-105, doi: 10.1080/19336918.2018.1540903.
 29. Song, Y., Zheng, S., Wang, J., Long, H., Fang, L., Wang, G., Li, Z., Que, T., Liu, Y., Li, Y., Zhang, X., Fang, W., and Qi, S. (2017) Hypoxia-induced PLOD2 promotes proliferation, migration and invasion via PI3K/Akt signaling in glioma, *Oncotarget*, **8**, 41947-41962, doi: 10.18632/oncotarget.16710.
 30. Qi, Q., Huang, W., Zhang, H., Zhang, B., Sun, X., Ma, J., Zhu, C., and Wang, C. (2021) Bioinformatic analysis of PLOD family member expression and prognostic value in non-small cell lung cancer, *Transl. Cancer Res.*, **10**, 2707-2724, doi: 10.21037/ter-21-73.
 31. Wan, J., Qin, J., Cao, Q., Hu, P., Zhong, C., and Tu, C. (2020) Hypoxia-induced PLOD2 regulates invasion and epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinoma cells, *Genes Genomics*, **42**, 317-324, doi: 10.1007/s13258-019-00901-y.
 32. Ngo, T. T., and Lenhoff, H. M. (1980) A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, *Anal. Biochem.*, **105**, 389-397, doi: 10.1016/0003-2697(80)90475-3.
 33. Petrov, Iu. P., Neguliaev, Iu. A., and Tsupkina, N. V. (2014) Morphology of NCTC cells upon a contact with type I collagen added to culture medium [in Russian], *Tsitologija*, **56**, 591-598.
 34. Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Laubach, V. E., Moskowitz, M. A., French, B. A., Ley, K., and Liao, J. K. (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase, *Nat. Med.*, **8**, 473-479, doi: 10.1038/nm0502-473.
 35. Yukawa, H., Shen, J., Harada, N., Cho-Tamaoka, H., and Yamashita, T. (2005) Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca²⁺ mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons, *Neuroscience*, **130**, 485-496, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.037.
 36. Matsuda, K., Sasaki, M., Baba, H., and Kamiya, Y. (2022) Neuronal nitric oxide synthase suppression confers the prolonged analgesic effect of sciatic nerve block with perineural dexamethasone in postoperative pain model mice, *J. Pain*, **23**, 1765-1778, doi: 10.1016/j.jpain.2022.06.001.
 37. Calzetta, L., Chetta, A., Aiello, M., Pistocchini, E., and Rogliani, P. (2022) The impact of corticosteroids on human airway smooth muscle contractility and airway hyperresponsiveness: a systematic review, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15285, doi: 10.3390/ijms232315285.
 38. Jia, W. Y., and Zhang, J. J. (2022) Effects of glucocorticoids on leukocytes: genomic and non-genomic mechanisms, *World J. Clin. Cases*, **10**, 7187-7194, doi: 10.12998/wjcc.v10.i21.7187.
 39. Nunez, F. J., Johnstone, T. B., Corpuz, M. L., Kazarian, A. G., Mohajer, N. N., Tliba, O., Panettieri, R. A., Jr., Koziol-White, C., Roosan, M. R., and Ostrom, R. S. (2020) Glucocorticoids rapidly activate cAMP production via G(alpha) to initiate non-genomic signaling that contributes to one-third of their canonical genomic effects, *FASEB J.*, **34**, 2882-2895, doi: 10.1096/fj.201902521R.
 40. Hynes, D., and Harvey, B. J. (2019) Dexamethasone reduces airway epithelial Cl⁻ secretion by rapid non-genomic inhibition of KCNQ1, KCNN4 and KATP K⁺ channels, *Steroids*, **151**, 108459, doi: 10.1016/j.steroids.2019.108459.
 41. Freischlag, J. A., Colburn, M. D., Quinones-Baldrich, W. J., and Moore, W. S. (1992) Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril, *J. Surg. Res.*, **52**, 523-529, doi: 10.1016/0022-4804(92)90322-q.
 42. Liu, D., Xiong, R., Chen, X., Li, P., Ning, Y., Peng, Y., Zhao, Y., Yang, N., and Zhou, Y. (2014) The glucocorticoid dexamethasone inhibits U937 cell adhesion and neutrophil release via RhoA/ROCK1-dependent and independent pathways, *Cell. Physiol. Biochem.*, **33**, 1654-1662, doi: 10.1159/000362948.
 43. Wallerath, T., Gath, I., Aulitzky, W. E., Pollock, J. S., Kleinert, H., and Forstermann, U. (1997) Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets, *Thromb. Haemost.*, **77**, 163-167, doi: 10.1055/s-0038-1655925.
 44. Bellefontaine, N., Hanchate, N. K., Parkash, J., Campagne, C., de Seranno, S., Clasadonte, J., d'Anglemonet de Tassigny, X., and Prevot, V. (2011) Nitric oxide as key mediator of neuron-to-neuron and endothelial-to-glia communication involved in the neuroendocrine control of reproduction, *Neuroendocrinology*, **93**, 74-89, doi: 10.1159/000324147.
 45. Urbach, V., Walsh, D. E., Mainprice, B., Bousquet, J., and Harvey, B. J. (2002) Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl⁻ secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium, *J. Physiol.*, **545**, 869-878, doi: 10.1113/jphysiol.2002.028183.
 46. Risteli, M., Ruotsalainen, H., Salo, A. M., Sormunen, R., Sipila, L., Baker, N. L., Lamande, S. R., Vimpari-

- Kauppinen, L., and Myllyla, R. (2009) Reduction of lysyl hydroxylase 3 causes deleterious changes in the deposition and organization of extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, **284**, 28204-28211, doi: 10.1074/jbc.M109.038190.
47. Salo, A. M., Wang, C., Sipila, L., Sormunen, R., Vapola, M., Kervinen, P., Ruotsalainen, H., Heikkinen, J., and Myllyla, R. (2006) Lysyl hydroxylase 3 (LH3) modifies proteins in the extracellular space, a novel mechanism for matrix remodeling, *J. Cell. Physiol.*, **207**, 644-653, doi: 10.1002/jcp.20596.
 48. Chen, Y., Guo, H., Terajima, M., Banerjee, P., Liu, X., Yu, J., Momin, A. A., Katayama, H., Hanash, S. M., Burns, A. R., Fields, G. B., Yamauchi, M., and Kurie, J. M. (2016) Lysyl hydroxylase 2 is secreted by tumor cells and can modify collagen in the extracellular space, *J. Biol. Chem.*, **291**, 25799-25808, doi: 10.1074/jbc.M116.759803.
 49. Wang, C., Ristiluoma, M. M., Salo, A. M., Eskelinen, S., and Myllyla, R. (2012) Lysyl hydroxylase 3 is secreted from cells by two pathways, *J. Cell. Physiol.*, **227**, 668-675, doi: 10.1002/jcp.22774.
 50. Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, *Microbes Infect.*, **5**, 1317-1327, doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.008.
 51. Sheng, Y., Peng, W., Huang, Y., Cheng, L., Meng, Y., Kwantwi, L. B., Yang, J., Xu, J., Xiao, H., Kzhyshkowska, J., and Wu, Q. (2023) Tumor-activated neutrophils promote metastasis in breast cancer via the G-CSF-RLN2-MMP-9 axis, *J. Leukoc. Biol.*, **113**, 383-399, doi: 10.1093/jleuko/qiad004.
 52. Bostanci Durmus, A., Dincer Cengiz, S., Yilmaz, H., Candar, T., GURSOY, A. Y., and Sinem Caglar, G. (2019) The levels of matrix metalloproteinase-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in different stages of endometriosis, *J. Obstetrics Gynaecol.*, **39**, 991-995, doi: 10.1080/01443615.2019.1584889.
 53. He, Z., Paule, M. G., and Ferguson, S. A. (2012) Low oral doses of bisphenol A increase volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male, but not female, rats at postnatal day 21, *Neurotoxicol. Teratol.*, **34**, 331-337, doi: 10.1016/j.ntt.2012.03.004.
 54. Jiguet-Jiglaire, C., Boissonneau, S., Denicolai, E., Hein, V., Lasseur, R., Garcia, J., Romain, S., Appay, R., Graillon, T., Mason, W., Carpentier, A. F., Brandes, A. A., Ouafik, L., Wick, W., Baaziz, A., Gigan, J. P., Arguello, R. J., Figarella-Branger, D., Chinot, O., and Tabouret, E. (2022) Plasmatic MMP9 released from tumor-infiltrating neutrophils is predictive for bevacizumab efficacy in glioblastoma patients: an AVAglio ancillary study, *Acta Neuropathol. Commun.*, **10**, 1, doi: 10.1186/s40478-021-01305-4.
 55. Fujita, M., Harada, E., Ikegame, S., Ye, Q., Ouchi, H., Inoshima, I., and Nakanishi, Y. (2007) Doxycycline attenuated lung injury by its biological effect apart from its antimicrobial function, *Pulmonary Pharmacol. Ther.*, **20**, 669-675, doi: 10.1016/j.pupt.2006.08.006.
 56. Moon, A., Gil, S., Gill, S. E., Chen, P., and Matute-Bello, G. (2012) Doxycycline impairs neutrophil migration to the airspaces of the lung in mice exposed to intratracheal lipopolysaccharide, *J. Inflamm.*, **9**, 31, doi: 10.1186/1476-9255-9-31.
 57. Zhang, F., Hu, L., Wu, Y. X., Fan, L., Liu, W. T., Wang, J., Sun, H., and Zhang, J. S. (2019) Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9, *Int. Immunopharmacol.*, **72**, 243-251, doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.015.
 58. Feng, S., Cen, J., Huang, Y., Shen, H., Yao, L., Wang, Y., and Chen, Z. (2011) Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins, *PLoS One*, **6**, e20599, doi: 10.1371/journal.pone.0020599.
 59. Ong, C. W., Pabisiak, P. J., Brilha, S., Singh, P., Roncaroli, F., Elkington, P. T., and Friedland, J. S. (2017) Complex regulation of neutrophil-derived MMP-9 secretion in central nervous system tuberculosis, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 31, doi: 10.1186/s12974-017-0801-1.
 60. Hamada, T., Fondevila, C., Busuttill, R. W., and Coito, A. J. (2008) Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury, *Hepatology*, **47**, 186-198, doi: 10.1002/hep.21922.
 61. Dayer, C., and Stamenkovic, I. (2015) Recruitment of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) to the fibroblast cell surface by lysyl hydroxylase 3 (LH3) triggers transforming Growth factor-beta (TGF-beta) activation and fibroblast differentiation, *J. Biol. Chem.*, **290**, 13763-13778, doi: 10.1074/jbc.M114.622274.
 62. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion, *Genes Dev.*, **13**, 35-48, doi: 10.1101/gad.13.1.35.
 63. Dorschner, R. A., Lee, J., Cohen, O., Costantini, T., Baird, A., and Eliceiri, B. P. (2020) ECRG4 regulates neutrophil recruitment and CD44 expression during the inflammatory response to injury, *Sci. Adv.*, **6**, eaay0518, doi: 10.1126/sciadv.aay0518.
 64. Shao, Y., Li, L., Liu, L., Yang, Y., Huang, J., Ji, D., Zhou, Y., Chen, Y., Zhu, Z., and Sun, B. (2022) CD44/ERM/F-actin complex mediates targeted nuclear degranulation and excessive neutrophil extracellular trap formation during sepsis, *J. Cell. Mol. Med.*, **26**, 2089-2103, doi: 10.1111/jcmm.17231.
 65. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes Dev.*, **14**, 163-176, doi: 10.1101/gad.14.2.163.

66. Chintala, S. K., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., Majumder, S., Giri, D. K., Kyritsis, A. P., Gokaslan, Z. L., and Rao, J. S. (1998) Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells, *J. Biol. Chem.*, **273**, 13545-13551.
67. Samanna, V., Ma, T., Mak, T. W., Rogers, M., and Chellaiah, M. A. (2007) Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function, *J. Cell. Physiol.*, **213**, 710-720, doi: 10.1002/jcp.21137.
68. Garvin, M. R., Alvarez, C., Miller, J. I., Prates, E. T., Walker, A. M., Amos, B. K., Mast, A. E., Justice, A., Aronow, B., and Jacobson, D. (2020) A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm, *eLife*, **9**, e59177, doi: 10.7554/eLife.59177.

EFFECT OF DEXAMETHASONE ON HUMAN NEUTROPHIL ADHESION AND CONCOMITANT SECRETION

S. I. Galkina^{1*}, E. A. Golenkina¹, N. V. Fedorova¹, A. L. Ksenofontov¹,
M. V. Serebryakova¹, V. I. Stadnichuk², L. A. Baratova¹, and G. F. Sud'ina^{1*}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: galkina@genebee.msu.ru; sudina@genebee.msu.ru*

² *Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Neutrophils play a dual role in protecting the body. They are able to penetrate infected tissues and destroy pathogens there, releasing aggressive bactericidal substances. Getting into the surrounding tissues, aggressive secretion products of neutrophils initiate the development of inflammatory processes. Invasion of neutrophils into tissues is observed during the development of pneumonia in patients with lung diseases of various etiologies, including acute respiratory distress syndrome caused by coronavirus disease. The synthetic corticosteroid hormone dexamethasone has a therapeutic effect in the treatment of lung diseases, including reducing mortality in patients with severe Covid-19. The acute (short-term) effect of dexamethasone on neutrophil adhesion to fibrinogen and concomitant secretion was studied. Dexamethasone did not affect either the attachment of neutrophils to the substrate or their morphology. The production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) by neutrophils during adhesion also did not change in the presence of dexamethasone. Dexamethasone stimulated the release of metalloproteinases in addition to proteins secreted by neutrophil adhesion under control conditions, and selectively stimulated the release of the free amino acid hydroxylysine, a product of lysyl hydroxylase. Metalloproteinases play a key role and closely interact with lysyl hydroxylase in the processes of rearrangement of the extracellular matrix. The therapeutic effect of dexamethasone may be associated with its ability, by changing the composition of neutrophil secretions, to reorganize the extracellular matrix in tissues, which can lead to improved gas exchange in patients with severe lung diseases.

Keywords: neutrophilic inflammation, neutrophil, adhesion, secretion, hydroxylysine, metalloproteinase, lysyl hydroxylase, reactive oxygen species, nitric oxide

ПРОТИВОПОЛОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ ГОМОЛОГОВ CRABP1 И CRABP2 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ

© 2023 А.Д. Еникеев¹, П.М. Абрамов¹, Д.С. Елкин¹, А.В. Комельков¹,
А.А. Беляева¹, Д.М. Силантьева², Е.М. Чевкина^{1*}

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: tchevkina@mail.ru

² ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.07.2023

После доработки 23.10.2023

Принята к публикации 30.10.2023

Резистентность опухолевых клеток к ретиноевой кислоте (РК), перспективному терапевтическому агенту, является основным ограничением для ее использования в клинической практике. Механизмы формирования РК-резистентности до сих пор мало понятны. Белки, связывающие ретиноевую кислоту, CRABP1 и CRABP2, являются важнейшими проводниками ретиноевого сигнала, однако роль обоих гомологов в регуляции чувствительности клеток к РК ранее практически не исследовалась. Также ранее не проводилось сравнение влияния CRABP1 и CRABP2 на пролиферацию клеток. В данной работе с использованием широкой панели клеточных линий рака молочной железы (РМЖ) впервые показано, что в РК-чувствительных клетках экспрессия CRABP1 ограничивается метилированием гена, при этом количество белка сильно варьирует. В средне-резистентных к РК линиях наблюдается высокий уровень CRABP1 как на уровне мРНК, так и белка, не меняющийся при подавлении метилирования ДНК. Максимально-резистентные к РК линии характеризуются полной репрессией *CRABP1*, реализуемой на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, а экзогенная экспрессия каждого из гомологов CRABP не оказывает влияние на исследуемые характеристики. Белки CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на пролиферацию и РК-чувствительность, причем в РК-чувствительных клетках CRABP1 стимулирует пролиферацию и РК-резистентность, а CRABP2 – снижает пролиферацию и сенсibiliзирует клетки к РК, в то время как в более резистентных клетках роль каждого из гомологов меняется на обратную. В целом, мы впервые показали, что белки CRABP оказывают различное воздействие на рост и чувствительность к РК клеток РМЖ (стимуляция, подавление или отсутствие воздействия) в зависимости от исходного уровня РК-чувствительности, при этом воздействие гомологов CRABP1 и CRABP2 на исследуемые характеристики всегда противоположно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретиноевая кислота, ATRA, CRABP1, CRABP2, пролиферация, РК-резистентность, рак молочной железы.

DOI: 10.31857/S0320972523120126, **EDN:** NNOYBA

ВВЕДЕНИЕ

Ретиноевая кислота является одним из наиболее активных внутриклеточных метаболитов ретинола (ретиноидов) и играет важнейшую роль в дифференцировке клеток и тканей. В связи с обнаруженной дифференцировочной, а в ряде случаев антипролиферативной активностью предпринимаются активные попытки использования РК, прежде всего, ее

наиболее активного метаболита, полностью *транс*-ретиноевой кислоты (all-*trans* retinoic acid, ATRA), а также других природных и синтетических ретиноидов в терапии злокачественных опухолей. Наиболее успешно ATRA применяется в лечении острого промиелоцитарного лейкоза [1]. Имеются и другие примеры использования ретиноидов для лечения солидных опухолей [2]. Например, предпринимались успешные попытки использования ATRA

Принятые сокращения: РК – ретиноевая кислота; РМЖ – рак молочной железы; ATRA – полностью *транс*-ретиноевая кислота; CRABP1 и CRABP2 – клеточные белки, связывающие ретиноевую кислоту 1 и 2; DAC – 5-Аза-2'-дезокситидин; RAR – рецептор ретиноевой кислоты; TSA – трихостатин А.

* Адресат для корреспонденции.

для лечения опухолей головы и шеи [3], а также 13-*цис*-РК и фенретинида (4-НРР) для лечения пациентов с нейробластомой [4]. Одним из основных ограничений терапии на основе ретиноидов является быстрое приобретение опухолевыми клетками резистентности [5, 6], механизмы формирования которой остаются не до конца понятными. РК регулирует экспрессию нескольких сотен генов с помощью активации ядерных рецепторов, прежде всего, транскрипционных факторов RAR (Retinoic acid receptors) [7]. Транспорт РК в ядро и защита в гидрофильной среде цитоплазмы осуществляется липид-связывающими белками семейства *i*lBP – CRABP1, CRABP2, FABP5 [8]. Белки, связывающие РК, CRABP1 и CRABP2 (Cellular retinoic acid binding proteins 1, 2), являются эволюционно высококонсервативными и близкородственными белками. Их гомология по аминокислотным остаткам составляет 74%, также большим сходством отличается и третичная структура этих белков. Важно, что наиболее высоким сродством к РК характеризуется CRABP1 [9]. Основной четко доказанной функцией белка CRABP2 является связывание РК в цитоплазме, защита ее от деградации и транспортировка в ядро. В ядре происходит непосредственное взаимодействие РК-связанного CRABP2 с RAR-белками, и это взаимодействие приводит к усилению экспрессии RAR-зависимых генов [10]. Функция CRABP1 в отношении проведения ретиноевого сигнала на сегодняшний день менее понятна. Ряд данных указывает на сходство функций CRABP1 с CRABP2 [11, 12], однако имеются и данные о том, что скорость катаболизма РК увеличивается в присутствии CRABP1 [13], а формирование комплекса РК–CRABP1 способствует взаимодействию РК с CYP26A1 (основным ферментом ее катаболизма) [14]. Более того, экспрессия CRABP1 приводит к подавлению транскрипции некоторых ретиноид-респонсивных генов [15]. В соответствии с этими данными, одной из основных функций CRABP1 может быть негативная регуляция активности РК и защита клетки от ее избытка, которая осуществляется за счет удержания РК в цитоплазме (секвестрирования) или даже за счет усиления ее метаболизма [13–15].

Участие белков CRABP в канцерогенезе показано многократно, однако данные о роли каждого из гомологов в опухолевой прогрессии очень противоречивы. Принято считать, что CRABP2 в большинстве клеток выполняет роль опухолевого супрессора, преимущественно за счет активации CRABP2/RAR сигнального пути и стимуляции транскрипции дифференциро-

вочных и проапоптотических генов [16, 17]. Однако в некоторых типах опухолей CRABP2 способствует опухолевой прогрессии, а его уровень коррелирует с агрессивностью опухолей и негативным прогнозом заболевания [18–21]. Еще более противоречива роль CRABP1 в канцерогенезе. Экспрессия CRABP1 повышена при раке поджелудочной железы [22], немелкоклеточном раке легкого [23], а ее снижение характерно для папиллярной карциномы щитовидной железы [24] и плоскоклеточного рака пищевода [25]. Имеется ряд данных о метилировании гена *CRABP1* во многих опухолях, причем уровень метилирования коррелировал со степенью злокачественности [24–26].

Значение белков CRABP в развитии резистентности к РК исследовалось крайне мало. Показано, что CRABP1 усиливает РК-резистентность клеток рака шейки матки [27], а CRABP2 снижает РК-резистентность клеток рака молочной железы (РМЖ) [28]. При этом лишь в единственной работе, выполненной на линии клеток РМЖ MCF7, сравнивалось значение обоих гомологов, которое показало, что CRABP1 способствует резистентности, а CRABP2 – чувствительности клеток к действию АТРА [16].

Данное исследование является продолжением ранее опубликованной работы [29] и посвящено изучению роли белков CRABP в РК-резистентности и прогрессии РМЖ. С использованием широкой панели клеточных линий с различным уровнем РК-чувствительности впервые проведено исследование особенностей экспрессии генов *CRABP1* и *CRABP2*, а также влияния белков CRABP на рост и РК-резистентность. В работе обнаружено, что в максимально-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ эндогенная экспрессия обоих белков отсутствует и не восстанавливается при ингибировании метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, а экзогенная экспрессия каждого из гомологов не влияет на исследуемые характеристики. В высокочувствительных клетках экзогенная экспрессия *CRABP1* стимулирует, а *CRABP2* подавляет рост и РК-резистентность. В клетках более резистентных линий CRABP1 и CRABP2 также оказывают противоположный эффект в отношении исследуемых характеристик, однако роль каждого из гомологов меняется на обратную – CRABP1 подавляет, а CRABP2 усиливает рост и РК-резистентность. Полученные данные свидетельствуют о противоположном функциональном значении белков CRABP1 и CRABP2 в проведении ретиноевого сигнала и прогрессии РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе были использованы клеточные линии РМЖ из коллекции АТСС: ER-позитивные – MCF7 (HTB-22), T47D (HTB-133); HER2-позитивные – SKBR3 (HTB-30), HCC1954 (CRL-2338), MDA-MB-453 (HTB-131); с трижды-негативным рецепторным статусом (с отсутствием экспрессии ER, PR и HER2) – HCC1937 (CRL-2336), MDA-MB-468 (HTB-132), MDA-MB-231 (HTB-26), HBL100 (HTB-124). Для направленной модификации экспрессии использованы клетки-паковщицы 293FT («Invitrogen», США) и GP293 («Clontech», США). Линии MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100 культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 0,294 мг/мл L-глутамина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина, при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Линии T47D, SKBR3, HCC1954, HCC1937 культивировали в среде RPMI («ПанЭко») с теми же добавками и в тех же условиях.

Анализ чувствительности клеток к ретиноевой кислоте. ATRA («Sigma-Aldrich», США) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) («ПанЭко») до концентрации 10 мМ. Клетки высаживали в количестве (5–30) × 10⁴ на 35-мм чашки (до достижения клетками 80% конfluence в конце инкубации), культивировали в течение 120 ч в присутствии 0,1–100 мкМ ATRA, снимали раствором Версена-Трипсина-ЭДТА («ПанЭко»), смешивали с красителем трипановый синий и подсчитывали в камере Горяева. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде, содержащей ДМСО в концентрации, соответствующей наибольшей концентрации ATRA. Количество живых клеток в контроле для каждой линии брали за 100%.

Оценка влияния ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазы (HDAC) на экспрессию CRABP1. Деметилирование ДНК проводили с помощью децитабина (DAC, 5-Аза-2'-дезоксцитидин) («Sigma-Aldrich») – специфического ингибитора ДНК-метилтрансферазы; для оценки значения деацетилирования гистонов использовали трихостатин А (TSA) («Sigma-Aldrich») – ингибитор гистондеацетилазы. Клетки всех исследованных линий РМЖ высаживали в количестве (15–80) × 10⁴ на 60-мм чашки, на следующий день добавляли 0,5–10 мкМ DAC и инкубировали 72 ч. Клетки MDA-MB-231 и HBL100 обрабатывали TSA (100 нМ TSA в течение 24 ч); со-

четанное воздействие обоих соединений оценивали с помощью инкубации с DAC (5 мкМ, 48 ч), а затем с TSA (100 нМ, 24 ч). Контрольные клетки инкубировали с ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации DAC или TSA.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ОТ ПЦР-РВ). Для получения кДНК использовали 2000 нг тотальной РНК; проводили реакцию обратной транскрипции с использованием MMLV-ревертазы, случайного дека-нуклеотидного праймера (20 мкМ) («Евроген», Россия). Реакцию проводили при 37 °С в течение 50 мин. Концентрацию кДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США), в реакцию ПЦР брали 100 нг кДНК на лунку. К 100 нг кДНК добавляли по 500 нМ смеси праймеров (табл. П1 в Приложении) и реакционную смесь для ПЦР-РВ в присутствии SYBR-green («Евроген», Россия). Амплификацию проводили в режиме: 95 °С – 15 с, 57 °С – 15 с, 72 °С – 30 с, 42 цикла. Относительный уровень экспрессии мРНК вычисляли методом ΔΔCt. Нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*.

Модификация экспрессии CRABP1 и CRABP2. Получение клеточных линий с экзогенной экспрессией CRABP1 и CRABP2. Молекулярное клонирование и псевдоретровирусную инфекцию проводили по описанной ранее методике [30]. Кодировочные последовательности *CRABP1* и *CRABP2* были клонированы в ретровирусный вектор pLXSN-neo («Clontech», США) по сайтам рестрикции XhoI («СибЭнзим», Россия) и BamHI («СибЭнзим») (cds *CRABP1* – NM_004378.3, cds *CRABP2* – NM_001878.4). Проверку осуществляли с помощью секвенирования, рестрикции полученных конструкторов, а также методом ПЦР с помощью следующих праймеров: pLXSN F: 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTTCG-3' и pLXSN R: 5'-TTTCCACACCTGGTTGCTGA-3'. Клетки-паковщицы GP293 трансфицировали плазмидами pLXSN и pVSV-G («Addgene», США) с добавлением реагента Polyfect («Qiagen», Германия); в течение последующих 96 ч (каждые 24 ч) собирали инокуляты вируса. Производные стабильные сублинии получали методом псевдоретровирусной инфекции с последующим отбором клеток на геницитине (500 мкг/мл – для SKBR3, 700 мкг/мл – для HBL100, 1000 мкг/мл – для MCF7 и MDA-MB-231). Для контрольных экспериментов получали стабильные производные тех же линий, в которые трансдуцировали не содержащий вставки вектор pLXSN-neo.

Получение клеточных линий с нокдауном CRABP1 и CRABP2. Предшественники малых шпилечных РНК (shRNA) к кодирующим последовательностям CRABP1 и CRABP2 были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1-puro («Addgene») по сайтам рестрикции AgeI (рестриктазой AsiGI («СибЭнзим»)) и EcoRI («СибЭнзим») по описанной ранее методике [29]. Последовательности представлены в табл. П2 в Приложении. Результаты проверяли с помощью секвенирования с использованием праймера pLKO.1-seq standart F: 5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3'. Клетки-паковщики 293FT трансфицировали плазмидами pLKO.1-puro, pVSV-G и pDR8.2 («Addgene») с добавлением реагента Polyfect; в течение последующих 96 ч (каждые 24 ч) собирали инокуляты вируса. Производные стабильные сублинии получали методом псевдолентивирусной инфекции с последующим отбором клеток на пуromицине (1 мкг/мл – для MCF7, MDA-MB-468 и HCC1937). Для контрольных экспериментов получали стабильные производные тех же линий, экспрессирующие shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP).

Иммуноблоттинг. Клетки в количестве $(8-15) \times 10^5$ в зависимости от клеточной линии лизировали RIPA-лизирующим буфером, для иммуноблоттинга брали по 15 мкг белка на лунку. Иммуноблоттинг проводили по описанной ранее методике [30]. Использовали первичные кроличьи антитела к CRABP1 («Sigma-Aldrich», HPA17203; 1 : 1000) или CRABP2 («Sigma-Aldrich», HPA004135; 1 : 500). В качестве контроля нанесения белка использовали первичные кроличьи антитела к β -актину («Abcam», Великобритания, ab8227; 1 : 5000). В качестве вторичных анител использовали козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Cell Signaling Technology», США, 29902; 1 : 65 000).

Статистический анализ. Для сравнения пролиферации двух групп клеток (количества живых клеток после 120 ч культивирования) использовали *t*-критерий Стьюдента. Для анализа РК-резистентности клеток после 5 дней инкубации с ATRA использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для сравнения относительного уровня экспрессии мРНК в двух клеточных линиях использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения относительного уровня экспрессии мРНК в группах клеток по РК-резистентности использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для расчета коэффициента корреляции продукции белков использовали критерий корреляции

Спирмена. Статистически значимыми во всех случаях считали значения $p < 0,05$. Все данные были получены в результате трех независимых экспериментов и представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение (SD). Для расчетов и построения графиков была использована программа GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия CRABP1 и CRABP2 в РК-чувствительных клетках варьирует в широком диапазоне и отсутствует в максимально-резистентных клетках. Ранее мы показали, что уровень РК-чувствительности/резистентности клеток РМЖ варьирует в широком диапазоне [29]. По нашим данным, ATRA оказывает преимущественно не цитотоксическое, а антипролиферативное действие. В клетках наблюдается задержка клеточного цикла в Go/G1 и незначительное увеличение клеток в позднем апоптозе-некрозе. На основании сравнительного анализа линии клеток, пролиферация которых снижалась при инкубации с ATRA в концентрации до 10 мкМ, были отнесены к РК-чувствительным. Среди них были выделены линии, чувствительные к дозам РК, приближенным к физиологическим значениям (до 1 мкМ – «максимально-чувствительные») и линии, чувствительные к средним концентрациям ATRA (до 10 мкМ – «средне-чувствительные»). К первой группе относились клетки, пролиферация которых снижалась более чем в 2 раза по сравнению с контролем (т.е. количество живых клеток после инкубации с ATRA снижалось до 50% и более при 0,1–1 мкМ ATRA). Ко второй группе относились клетки, пролиферация которых снижалась до тех же значений в диапазоне 1–10 мкМ ATRA. Линии клеток, пролиферация которых не снижалась при обработке 10 мкМ ATRA, были отнесены к РК-резистентным. РК-резистентные линии, в свою очередь, разделились на «средне-резистентные» и «максимально-резистентные», пролиферация которых снижалась в 2 раза при 50 мкМ и более 100 мкМ ATRA соответственно (табл. 1).

Мы показали, что данные линии также сильно различаются по уровню экспрессии белка CRABP1 (от полного отсутствия до высокого уровня продукции), при этом строгой корреляции экспрессии CRABP1 с РК-чувствительностью обнаружено не было, однако в большинстве РК-чувствительных клеток CRABP1 детектировался (за исключением SKBR3),

Таблица 1. Уровень РК-чувствительности линий клеток РМЖ*

РК-чувствительные, ER(+) или HER2(+)		РК-резистентные, трижды негативный статус	
максимально-чувствительные	средне-чувствительные	средне-резистентные	максимально-резистентные
SKBR3 (IC ₅₀ = 0,05 мкМ)	MCF7 (IC ₅₀ = 0,63 мкМ)	HCC1937 (IC ₅₀ = 50 мкМ)	MDA-MB-231 (IC ₅₀ = 94 мкМ)
T47D (IC ₅₀ = 0,13 мкМ)	HCC1954 (IC ₅₀ = 2,90 мкМ)	MDA-MB-468 (IC ₅₀ = 57 мкМ)	HBL100 (IC ₅₀ = 93 мкМ)

Примечание. * На основании ранее опубликованных данных [29]. IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования) – концентрация ATRA, необходимая для 50%-ного ингибирования роста клеток по сравнению с контролем.

в то время как в максимально-резистентных линиях белок отсутствовал [29]. Мы предположили, что если экспрессия CRABP1 и РК-резистентность клеток РМЖ связаны, то данная взаимосвязь может быть сложнее, чем казалось на первый взгляд. Для более детального изучения возможной связи экспрессии CRABP1 с РК-резистентностью в данной работе мы сравнили уровень мРНК *CRABP1* в клетках той же панели линий РМЖ: SKBR3, T47D, MCF7, HCC1954, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100 (по 2 линии из каждой группы РК-чувствительности). Результаты анализа ожидаемо подтвердили, что в максимально-резистентных клетках MDA-MB-231 и HBL100 (с отсутствием белка CRABP1), мРНК *CRABP1* практически не детектируется, а в средне-резистентных клетках HCC1937 и MDA-MB-468 с высокой продукцией белка CRABP1 мРНК *CRABP1* продуцировалась на максимальном уровне (рис. 1, а). В РК-чувствительных линиях экспрессия *CRABP1* была существенно ниже, причем, к нашему удивлению, в клетках MCF7 и HCC1954 при достаточно высоком уровне белка CRABP1 (рис. 1, б) мРНК детектировалась на крайне низком уровне (значения Ct = 36 и более циклов). Интересно, что для CRABP2 такого эффекта не наблюдается, т.е. уровень мРНК соотносится с уровнем белка. Мы также подтвердили корреляцию между уровнями белков CRABP1 и CRABP2 в исследуемых линиях РМЖ.

Коэффициент корреляции Спирмена, по данным обсчета трех независимых повторов эксперимента, составил $r = 0,8921$, p (two-tailed) $< 0,0001$.

Подавление метилирования ДНК приводит к повышению экспрессии CRABP1 в РК-чувствительных клетках, в то время как в РК-резистентных клетках продукция CRABP1 не восстанавливается при ингибировании метилирования ДНК и деацетилировании гистонов. Для того чтобы понять, связаны ли обнаружен-

ные различия в экспрессии мРНК *CRABP1* с ингибированием транскрипции, вызванным метилированием гена, клетки обрабатывали деметилирующим агентом DAC. Во всех РК-чувствительных клетках (SKBR3, T47D, MCF7 и HCC1954) обработка приводила к увеличению экспрессии, причем количество мРНК *CRABP1* возрастало при повышении концентрации DAC (рис. 2, а). В тех же линиях происходило и увеличение белка CRABP1, в том числе в линии SKBR3, где в стандартных условиях продукция этого белка не детектировалась. В то же время во всех РК-резистентных клетках (HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100) обработка DAC не влияла на экспрессию CRABP1. На рис. 2, б представлены примеры максимально выраженного эффекта (клетки SKBR3) и отсутствия изменений (клетки HCC1937).

Такие результаты указывают на то, что в полностью РК-резистентных клетках отсутствие экспрессии CRABP1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка связано с более глубоким уровнем репрессии и обусловлено, по-видимому, иными механизмами эпигенетической регуляции.

В качестве одного из возможных механизмов, обуславливающих эпигенетическое молчание *CRABP1* в максимально-резистентных клетках, мы исследовали деацетилирование гистонов, которое способствует конденсации нуклеосом и приводит к репрессии генов. Мы обнаружили, что обработка TSA приводит к крайне незначительной индукции экспрессии *CRABP1* в обеих линиях (MDA-MB-231 и HBL100), (продукт начинает регистрироваться на 38–39-м цикле). Более того, сочетание воздействия DAC и TSA не приводит к дополнительному повышению экспрессии *CRABP1* в MDA-MB-231. В то же время в клетках HBL100 данное сочетание привело к увеличению мРНК *CRABP1* более чем в 100 раз. Однако, как и в случае с DAC, инкубация клеток

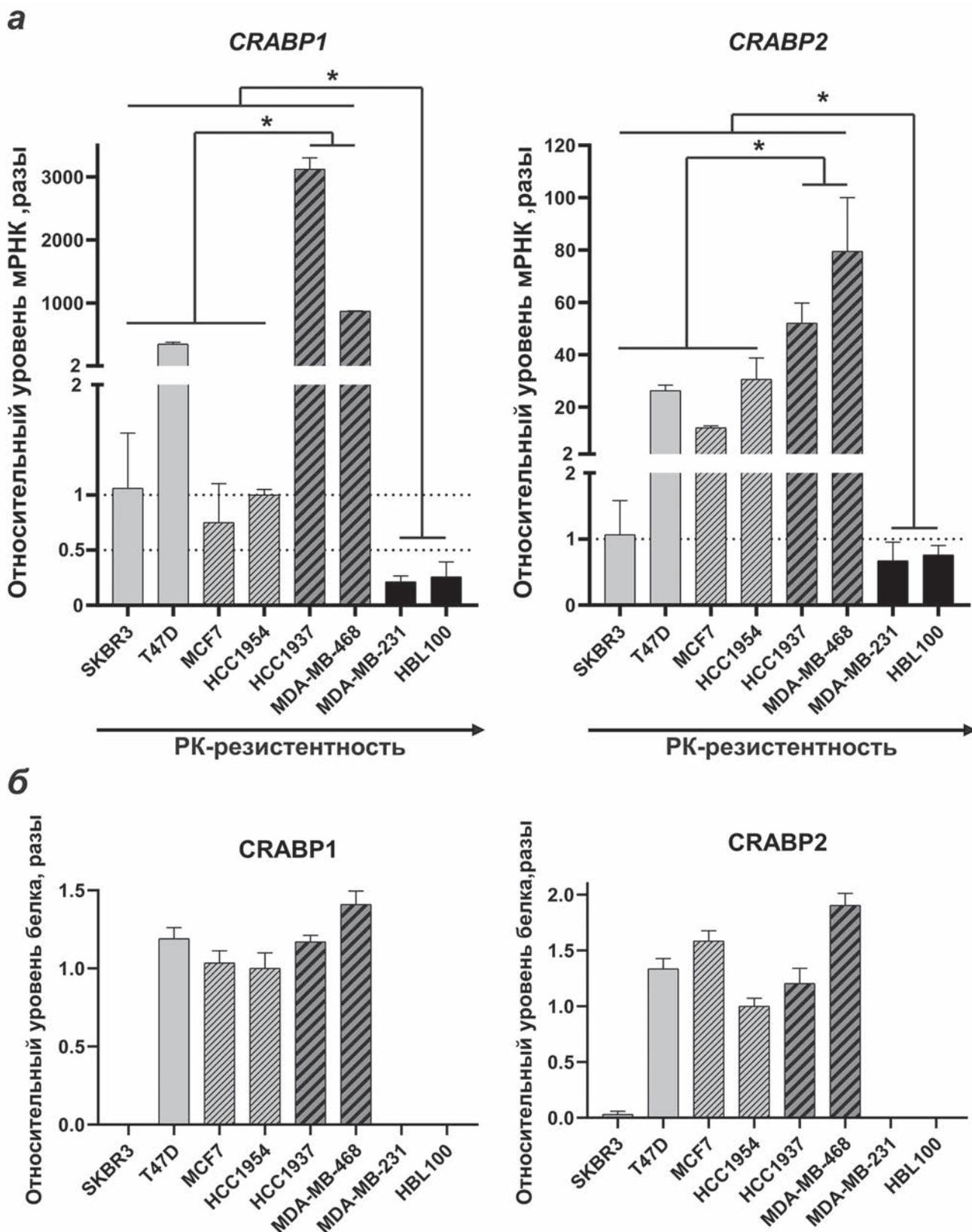


Рис. 1. Анализ экспрессии CRABP1 и CRABP2 в линиях клеток РМЖ с разным уровнем РК-чувствительности. *а* – Сравнение уровня экспрессии мРНК *CRABP1* и *CRABP2* методом ОТ-ПЦР РВ. За единицу брали значение относительного уровня экспрессии мРНК *CRABP* в клетках SKBR3. Стрелкой иллюстрировано возрастание уровня РК-резистентности. *б* – Сравнение продукции белков CRABP в исследуемых линиях РМЖ (денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга [29]). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»)

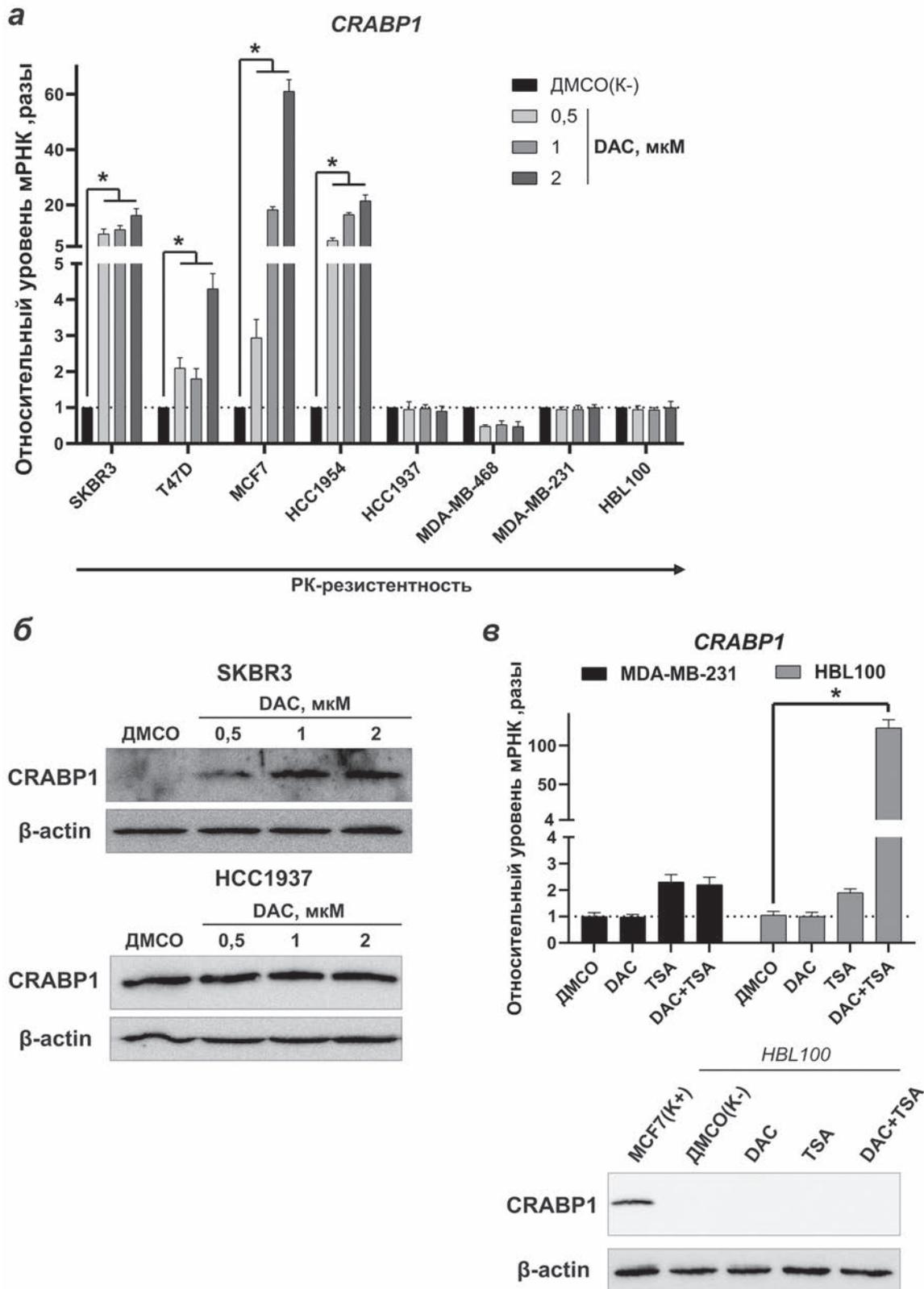


Рис. 2. Анализ экспрессии CRABP1 в клетках РМЖ после обработки DAC и TSA. *а* – Уровень экспрессии мРНК *CRABP1* до и после обработки DAC. Стрелкой иллюстрировано возрастание уровня ПК-резистентности. *б* – Продукция белка CRABP1 после обработки DAC в клетках SKBR3 (пример восстановления) и HCC1937 (пример отсутствия увеличения). *в* – Влияние DAC, TSA и комбинации DAC + TSA на экспрессию мРНК *CRABP1* в клетках MDA-MB-231 и HBL100. В качестве примера отсутствия индукции экспрессии приведены результаты анализа экспрессии белка CRABP1 в клетках HBL100. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»). DAC – 5-Аза-2'-дезоксцитидин, TSA – трихостатин А

HBL100 с TSA или с DAC + TSA в комбинации не индуцировала продукцию белка CRABP1. В клетках MDA-MB-231 продукция белка CRABP1 при обработке TSA или DAC + TSA ожидаемо не детектировалась (рис. 2, в).

Таким образом, увеличение экспрессии CRABP1 при деметилировании наблюдалось во всех исследованных РК-чувствительных и не детектировалось в РК-резистентных линиях РМЖ (как в полностью РК-резистентных (MDA-MB-231 и HBL100), так и в клетках с промежуточным уровнем РК-резистентности (MDA-MB-468 и HCC1937). В последнем случае такой эффект объясняется, очевидно, отсутствием метилирования гена CRABP1, учитывая, что все эти клетки демонстрируют высокий уровень мРНК и белка CRABP1. В пользу такого объяснения говорит и то, что среди РК-чувствительных клеток минимальное деметилирование наблюдалось в клетках T47D с максимальным (среди РК-чувствительных клеток) уровнем базовой экспрессии CRABP1. В максимально-резистентных клетках эпигенетическое молчание CRABP1 реализуется, по-видимому, с помощью нескольких механизмов регуляции транскрипции, а также на посттранскрипционном уровне (как в случае HBL100).

В РК-чувствительных клетках белки CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на рост и выживание в присутствии ATRA; в полностью РК-резистентных клетках оба гомолога не влияют на исследуемые характеристики. На основании полученных результатов мы предположили, что связь CRABP1 с РК-чувствительностью может быть более сложной, и ее характер может, по-видимому, меняться в зависимости от исходного уровня чувствительности/резистентности к РК, гормонального статуса, степени малигнизации клеток и других факторов. В связи с этим мы исследовали влияние его экспрессии на РК-чувствительность, а также на скорость роста в стандартных условиях (показатель уровня малигнизации) клеток РМЖ с различным исходным уровнем РК-чувствительности и различным гормональным статусом.

В РК-чувствительных клетках РМЖ CRABP1 стимулирует, а CRABP2 подавляет рост и выживание в присутствии ATRA. Ранее мы показали, что экзогенная экспрессия CRABP1 в максимально-чувствительной линии SKBR3 приводит к увеличению пролиферации и уровня РК-резистентности клеток [31]. Для проверки универсальности этого эффекта в данной работе мы выбрали средне-чувствительную линию MCF7. Поскольку

в клетках MCF7 мРНК CRABP1 детектировалась на крайне низком уровне, влияние CRABP1 оценивали с помощью гиперэкспрессии. Проверка эффективности трансфекции показала трехкратное увеличение уровня белка CRABP1 в производной сублинии по сравнению с контрольной сублинией клеток MCF7pLXSN (рис. 3, а). Анализ роста клеток в стандартных условиях культивации и в присутствии ATRA показал, что гиперэкспрессия CRABP1 привела к достоверному повышению пролиферации и усилению РК-резистентности (рис. 3, а). Таким образом, в линии MCF7, как и в клетках SKBR3, CRABP1 способствует малигнизации и снижает РК-чувствительность. Данные результаты согласуются с гипотетической ролью CRABP1 в поддержании РК в неактивном состоянии (секвестрировании в цитоплазме) и «противодействии» CRABP2, который, согласно большинству литературных данных, является супрессором роста опухолей, проводящим РК-зависимый дифференцировочный, апоптотический и антипролиферативный сигналинг.

Для проверки этого предположения и определения функционального значения CRABP2 мы исследовали его влияние на те же характеристики тех же клеток SKBR3 и MCF7. В клетках SKBR3, характеризующихся крайне низкой экспрессией CRABP2 и CRABP1, влияние CRABP2 оценивали также с помощью анализа эффекта экзогенной экспрессии. Высокий уровень экспрессии CRABP2 в полученной сублинии подтвердил эффективность трансдукции (рис. 3, б). Увеличение экспрессии CRABP2 привело к снижению пролиферации клеток SKBR3 и сделало их еще более чувствительными к действию РК, т.е. эффект гиперэкспрессии CRABP2 оказался противоположным тому, который оказывала гиперэкспрессия CRABP1 в тех же клетках, а также в клетках MCF7.

В клетках MCF7 исходный уровень экспрессии мРНК CRABP2 (в отличие от CRABP1) был достаточно высоким (рис. 1, а) для проведения нокдауна (предпочтительный метод, позволяющий более эффективно оценить роль исследуемого белка). Подавление эндогенной экспрессии (нокдаун) CRABP2 в клетках MCF7 проводили с помощью трансдукции последовательностей малых шпилечных РНК к CRABP2 (sh1 и sh2, последовательности приведены в табл. П2 в Приложении) в составе лентивирусного вектора pLKO.1-puro. Оценка эффективности показала снижение уровня белка в 5 раз в обеих стабильных производных сублиниях MCF7 (sh1CRABP2

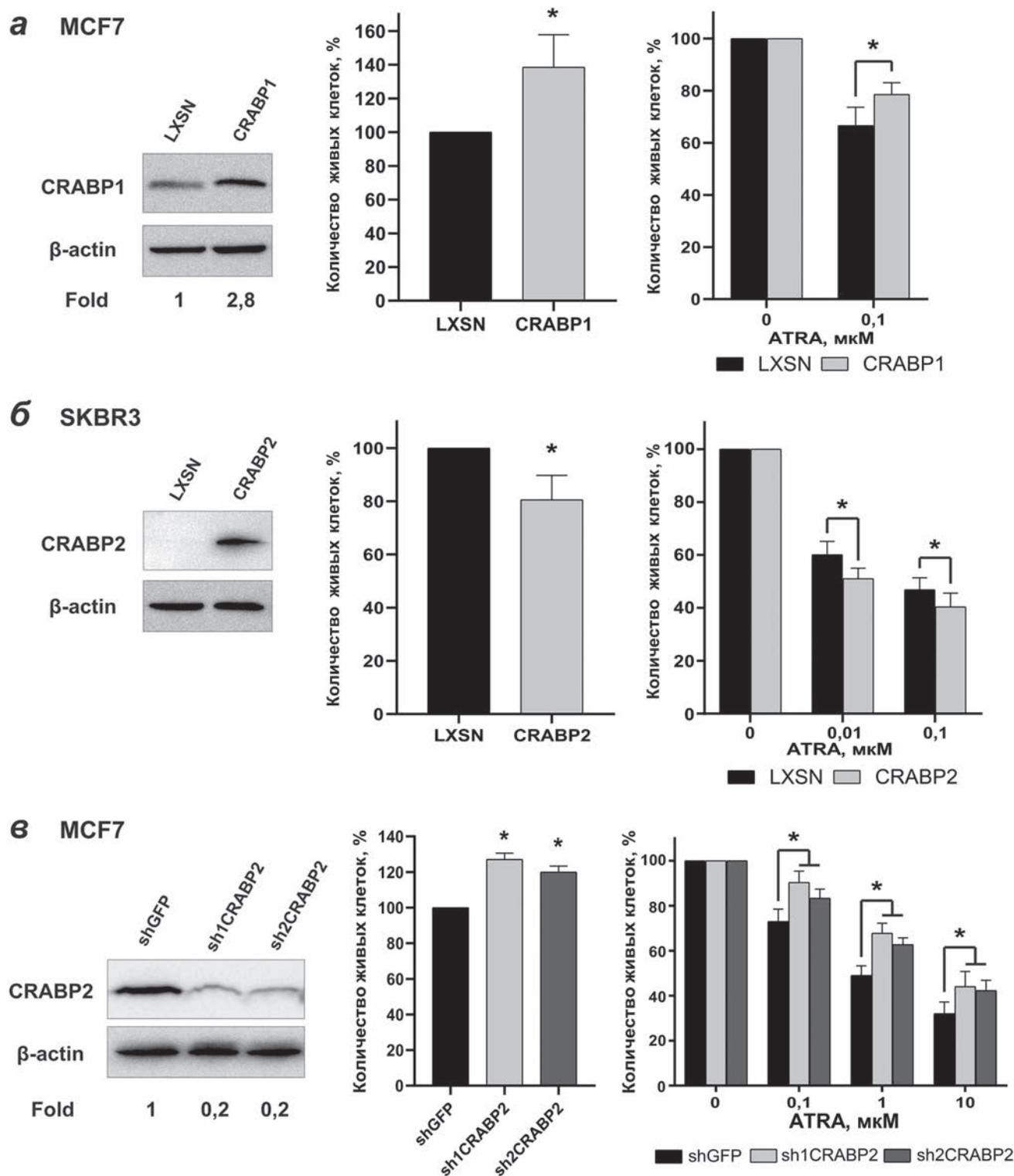


Рис. 3. Влияние модификации экспрессии CRABP на пролиферацию и РК-чувствительность клеток MCF7 и SKBR3. *а* – Влияние гиперэкспрессии CRABP1 на пролиферацию клеток MCF7 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *б* – Влияние гиперэкспрессии CRABP2 на пролиферацию клеток SKBR3 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *в* – Влияние нокдауна CRABP2 на пролиферацию клеток MCF7 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Количество живых клеток в контрольной линии было принято за 100%; цифрами указаны результаты денситометрического анализа с учетом значений экспрессии белка домашнего хозяйства, β -актина («Fold»). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»). Каждая панель (*а–в*) состоит из трех частей: в левой части представлены результаты анализа продукции белков CRABP в производных сублиниях методом иммуноблоттинга; в центральной части представлены результаты анализа пролиферации клеток в стандартных условиях; в правой части представлены результаты пролиферации клеток в присутствии ATRA

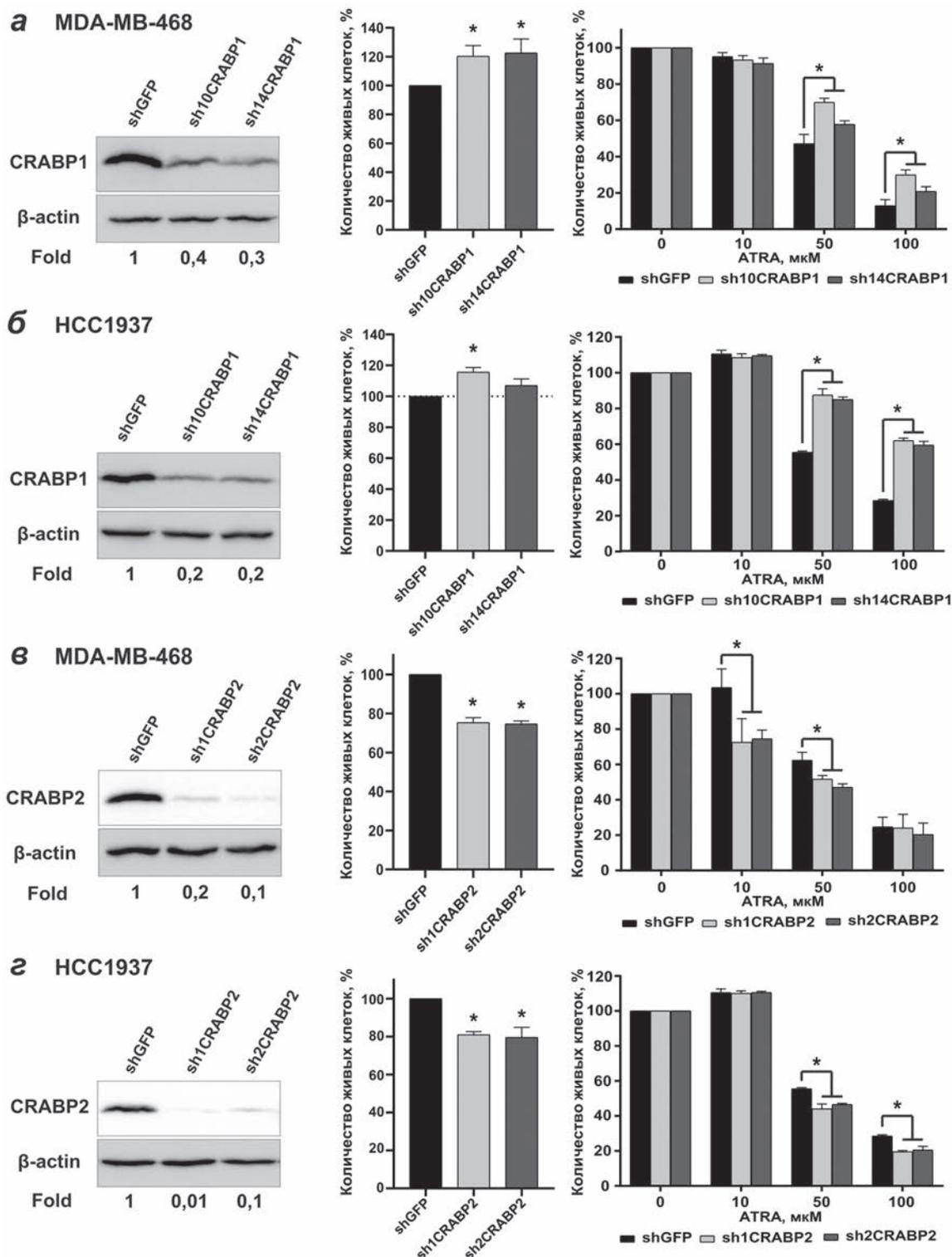


Рис. 4. Влияние нокдауна *CRABP* на пролиферацию и РК-чувствительность средне-резистентных клеток MDA-MB-468 и HCC1937. *а* – Влияние нокдауна *CRABP1* на пролиферацию клеток MDA-MB-468 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *б* – Влияние нокдауна *CRABP1* на пролиферацию клеток HCC1937 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *в* – Влияние нокдауна *CRABP2* на пролиферацию клеток MDA-MB-468 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *г* – Влияние нокдауна *CRABP2* на пролиферацию клеток HCC1937 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Количество живых клеток в контрольной линии было принято за 100%; цифрами указаны результаты денситометрического анализа с учетом значений экспрессии белка домашнего хозяйства, β-актина («Fold»). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»). Каждая панель (*а–г*) состоит из трех частей: в левой части представлены результаты анализа продукции белков CRABP в производных сублиниях методом иммуноблоттинга; в центральной части представлены результаты анализа пролиферации клеток в стандартных условиях; в правой части представлены результаты пролиферации клеток в присутствии ATRA.

и sh2CRABP2) по сравнению с контрольной сублинией MCF7 shGFP (рис. 3, в). Сравнение роста в стандартных условиях и выживания в присутствии ATRA показало, что подавление CRABP2 привело к повышению как пролиферации, так и РК-резистентности (рис. 3, в) клеток обеих производных сублиний. Это означает, что нокдаун *CRABP2* оказывает эффект, аналогичный тому, который вызывает гиперэкспрессия *CRABP1* в тех же клетках MCF7 (а также в клетках SKBR3, как было показано нами ранее). Данные результаты свидетельствуют о том, что в РК-чувствительных клетках CRABP1 и CRABP2 выполняют противоположные функции в контексте проведения ретинового сигналинга и в опухолевой прогрессии, что подтверждает приведенную выше гипотезу.

В средне-резистентных клетках РМЖ *CRABP1* подавляет, а *CRABP2* стимулирует рост и выживание в присутствии ATRA. Далее мы исследовали влияние обоих гомологов CRABP на те же показатели роста и выживаемости РК-резистентных клеток, которые относятся к трижды негативному типу РМЖ. Для этой задачи были выбраны две средне-резистентные линии, HCC1937 и MDA-MB-468. В соответствии с исходным уровнем РК-чувствительности эти линии обладают наиболее высоким потенциалом изменения как в сторону понижения, так и в сторону повышения РК-чувствительности. Кроме того, в этих линиях оба гомолога CRABP демонстрируют исходно высокий уровень как мРНК, так и белка, что позволило провести подавление экспрессии и оценить эффект нокдауна каждого из генов на пролиферацию и РК-резистентность. Нокдаун *CRABP1* в клетках HCC1937 и MDA-MB-468 проводили с помощью аналогичного подхода, для чего использовали последовательности sh10 и sh14 к *CRABP1* (последовательности приведены в табл. П2 в Приложении), которые были клонированы в тот же лентивирусный вектор pLKO.1-puro и трансдуцированы с помощью псевдолентивирусной инфекции. Проверка эффективности нокдауна *CRABP1* показала снижение уровня белка в 2,5 и 3,3 раза в производных сублиниях MDA-MB-468, sh10CRABP1 и sh14CRABP1 соответственно, а также в 5 раз – в обеих производных сублиниях HCC1937, sh10CRABP1 и sh14CRABP1 (рис. 4, а и б).

К нашему удивлению, нокдаун *CRABP1* в обоих случаях привел к увеличению пролиферации и повышению РК-резистентности клеток (рис. 4, а и б). В одной из сублиний HCC1937 sh14CRABP1 разница в пролифе-

рации не достигала статистической значимости, однако тенденция увеличения пролиферации была аналогичной сублинии HCC1937 sh10CRABP1. Важно отметить, что нокдаун *CRABP1* вызвал сходный эффект в обеих линиях, HCC1937 и MDA-MB-468, и сопоставлено повлиял на обе характеристики, усиливая рост и выживание клеток. Полученные данные означают, что в РК-резистентных клетках функциональное значение CRABP1 меняется на противоположное – он оказывает рост-супрессирующее воздействие на опухоли и способствует РК-чувствительности.

В связи с полученными результатами вопрос о том, какое влияние на пролиферацию и РК-резистентность тех же клеток оказывает CRABP2, представлялся особенно интересным. Проверка эффективности нокдауна показала снижение белка CRABP2 в 5 и 10 раз в производных сублиниях MDA-MB-468 sh1CRABP2 и MDA-MB-468 sh2CRABP2, а также примерно в 100 и в 10 раз – в производных сублиниях HCC1937 sh1CRABP2 и HCC1937 sh2CRABP2 соответственно (рис. 4, в и г). Нокдаун *CRABP2* в обеих линиях привел к снижению как пролиферации, так и РК-резистентности (рис. 4, в и г), т.е. обе характеристики опять изменились сопоставлено, но в противоположном направлении по сравнению с эффектом нокдауна *CRABP1*. Причем в случае MDA-MB-468 значимые различия в количестве живых клеток обеих сублиний (sh1 и sh2) наблюдались уже при 10 мкМ ATRA, а при инкубации со 100 мкМ – терялись (по-видимому, за счет неспецифической гибели клеток), а в производных линиях HCC1937 – различия наблюдались с 50 мкМ ATRA и выше. Таким образом, подавление продукции белков CRABP1 и CRABP2 в обеих РК-резистентных линиях (HCC1937 и MDA-MB-468) оказывало противоположный эффект как в отношении пролиферации, так и РК-чувствительности. Эти результаты подтверждают данные, полученные на РК-чувствительных линиях MCF7 и SKBR3, и свидетельствуют о противоположном функциональном значении CRABP1 и CRABP2 в отношении исследуемых характеристик. В то же время мы видим, что направленность воздействия каждого из белков CRABP как в отношении пролиферации, так и РК-чувствительности меняется на противоположное в РК-резистентных по сравнению с РК-чувствительными клетками.

***CRABP1* и *CRABP2* не влияют на рост и выживание в присутствии ATRA максимально-резистентных клеток РМЖ.** Далее мы оценили влияние обоих гомологов на исследуемые

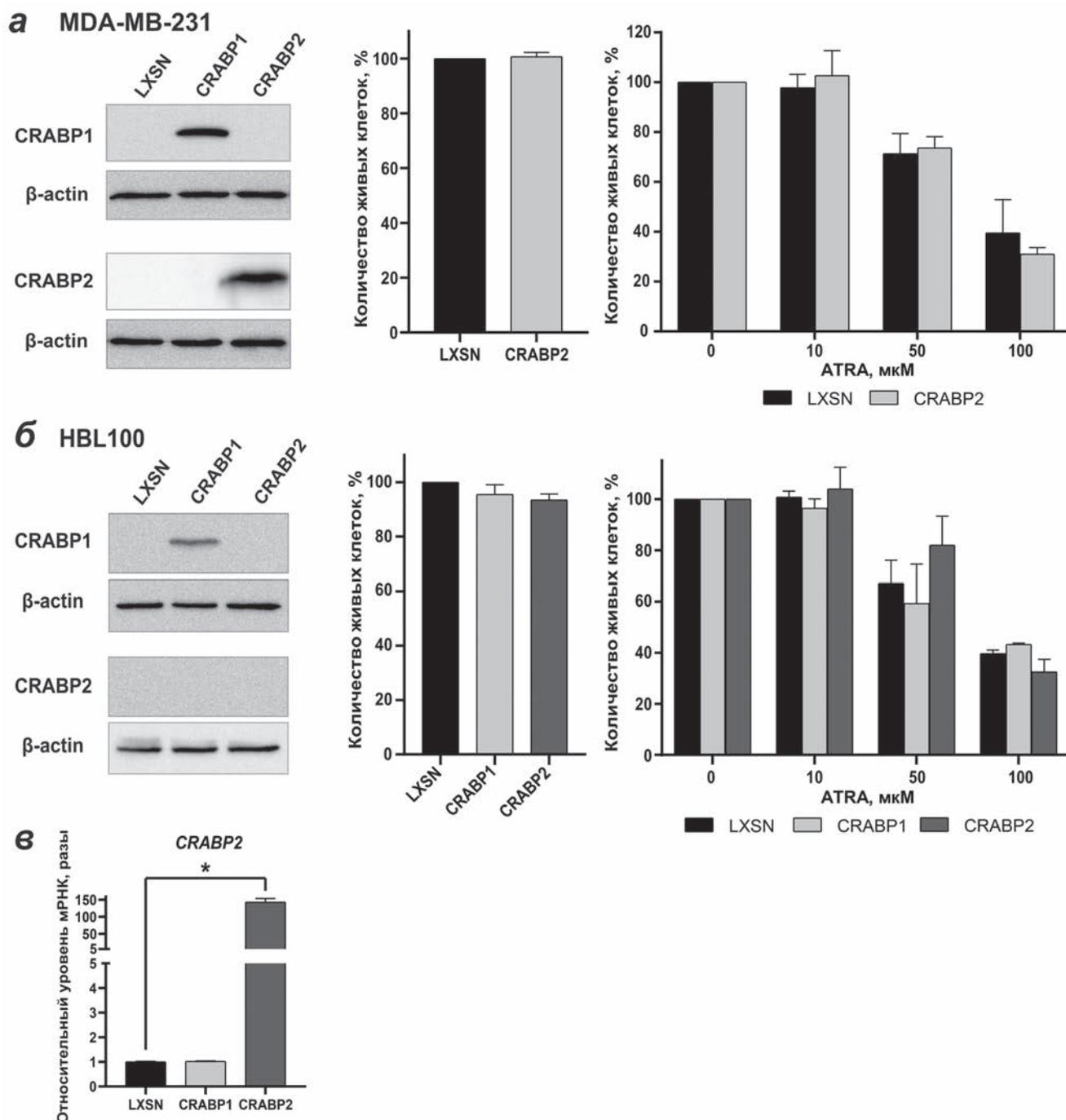


Рис. 5. Влияние гиперэкспрессии CRABP на пролиферацию и РК-чувствительность клеток MDA-MB-231 и HBL100. *а* – Влияние гиперэкспрессии CRABP2 на пролиферацию клеток MDA-MB-231 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *б* – Влияние гиперэкспрессии гомологов CRABP на пролиферацию клеток HBL100 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *в* – Сравнение экспрессии мРНК *CRABP2* в производных субклинах HBL100. Панели *а* и *б* состоят из трех частей: в левой части представлены результаты анализа продукции белков CRABP в производных субклинах методом иммуноблоттинга, в центральной части представлены результаты анализа пролиферации клеток в стандартных условиях, в правой части представлены результаты пролиферации клеток в присутствии ATRA. Отсутствие влияния CRABP1 на те же характеристики клеток MDA-MB-231 показано ранее [31]. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»)

характеристики «максимально-резистентных» клеток MDA-MB-231 и HBL100. Крайне низкий уровень мРНК, а также полное отсутствие продукции белков CRABP1 и CRABP2 не по-

зволяло провести нокдаун, поэтому в данных клетках, как и в случае с CRABP1 в клетках MCF7 и SKBR3, роль каждого из белков исследовали с помощью экзогенной экспрессии.

Таблица 2. Функциональное значение белков CRABP1 и CRABP2 в регуляции пролиферации и РК-резистентности клеток РМЖ с различным гормональным статусом и разным уровнем РК-чувствительности

Исходная РК-чувствительность	Чувствительные				Средне-резистентные				Максимально-резистентные			
	HER2(+)		ER(+)		трижды-негативный РМЖ				трижды-негативный РМЖ			
Гормональный статус	SKBR3		MCF7		HCC1937		MDA-MB-468		MDA-MB-231		HBL100	
Значение в пролиферации/ РК-резистентности	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.
CRABP1	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	–	–	–	–
CRABP2	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	–	–	–	н/и

Примечание. н/и – нет информации (в связи с отсутствием продукции белка CRABP2 при гиперэкспрессии мРНК *CRABP2*).

Результаты гиперэкспрессии CRABP1 в клетках MDA-MB-231 были получены и опубликованы ранее [31]. Согласно этим данным, экспрессия *CRABP1* не повлияла на исследуемые характеристики. Гиперэкспрессия *CRABP2* в клетках MDA-MB-231 также не привела к изменениям роста и РК-резистентности (рис 5, а). Аналогичные результаты после трансдукции обоих генов получены и для линии HBL100. При этом важно отметить, что трансдукция *CRABP2*, в отличие от *CRABP1*, в клетки HBL100 не привела к продукции белка, несмотря на более чем 100-кратное увеличение уровня мРНК *CRABP2*, по данным ПЦР-РВ в трех независимо полученных производных сублиниях (рис. 5, б). Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в максимально-резистентных линиях трижды-негативного РМЖ, характеризующихся отсутствием экспрессии обоих гомологов, экзогенная экспрессия как *CRABP1*, так и *CRABP2* не влияет на пролиферацию и РК-чувствительность. Важно отметить, что гиперэкспрессия *CRABP2* как в клетках MDA-MB-231, так и в HBL100 не повлияла на продукцию CRABP1, и наоборот. Эти результаты свидетельствуют об утрате максимально-резистентными клетками взаимосвязи между экспрессией двух гомологов CRABP, ранее показанной нами для клеток РК-чувствительных и средне-резистентных линий [29].

Результаты исследования влияния экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 на пролиферацию и РК-чувствительность клеток РМЖ обобщены в табл. 2.

Ниже представлены выводы, обобщающие полученные результаты.

1) Во всех исследованных клетках, чувствительных к РК, экспрессия *CRABP1* на уровне

мРНК ингибируется метилированием гена, при этом количество белка сильно варьирует – от отсутствия до высокого уровня, обусловленного в большей степени не продукцией, а, вероятно, высокой стабильностью продукта. В средне-резистентных линиях наблюдается высокий уровень экспрессии CRABP1 как на уровне мРНК, так и белка, не изменяющийся в ответ на ингибирование метилирования. Максимально-резистентные линии характеризуются глубокой репрессией *CRABP1*, реализуемой с участием нескольких различных механизмов, включая подавление транскрипции и посттранскрипционную регуляцию.

2) Экспрессия CRABP1 и CRABP2 на белковом уровне коррелирует между собой во всех исследуемых линиях ($r = 0,8921$, $p < 0,0001$).

3) Белки CRABP1 и CRABP2 обладают противоположным функциональным значением в аспекте опухолевой прогрессии (пролиферации клеток) и регуляции РК-чувствительности/резистентности: в РК-чувствительных клетках CRABP1 играет роль опухолевого промотора и способствует РК-резистентности, а CRABP2 – супрессора опухолевого роста и способствует РК-чувствительности, в то время как в более РК-резистентных роль обоих гомологов меняется на обратную.

4) В максимально-резистентных клетках, характеризующихся глубокой репрессией обоих гомологов, экзогенная экспрессия каждого из гомологов не оказывает влияние на исследуемые характеристики. В этих же клетках утрачивается и показанная нами ранее регуляторная связь данных гомологов (CRABP2-зависимая регуляция продукции CRABP1).

Гипотетическая модель участия CRABP1 и CRABP2 в опухолевой прогрессии и РК-резистентности приведена на рис. 6.

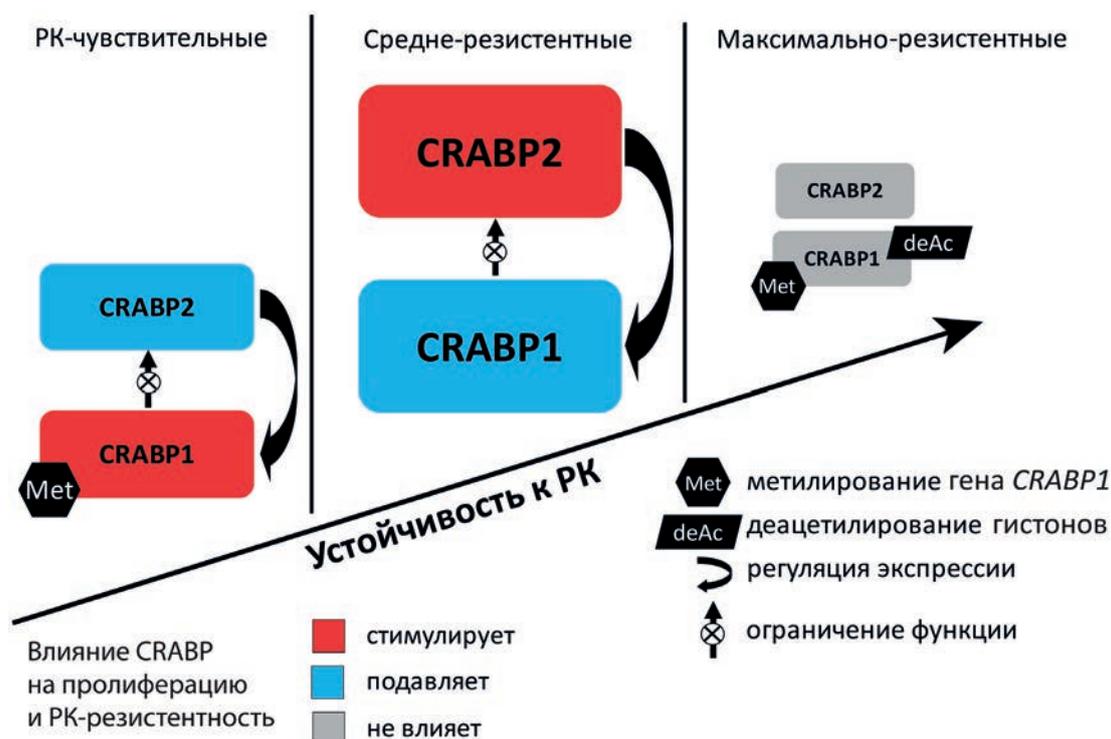


Рис. 6. Гипотетическая модель связи экспрессии CRABP1 и CRABP2 с опухолевой прогрессией и ПК-резистентностью. Цветными фигурами обозначены белки CRABP1 и CRABP2, размер отражает изменение уровня экспрессии. Цвет обозначает роль в пролиферации и ПК-резистентности клеток. Стрелками указаны регуляция экспрессии и функциональное влияние. Пояснения – в тексте

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что белки-шапероны CRABP являются важнейшими медиаторами активности ПК и ПК-зависимой регуляции транскрипции, до сих пор механизмы их участия в ретиновой сигнализации остаются не полностью понятными. В частности, остается открытым вопрос о сходстве или различиях функционального значения CRABP1 и CRABP2 в реализации транскрипционной активности ПК. Так, если основная роль CRABP2, связанная с транспортом ПК, относительно понятна (для этого белка показаны и ПК-независимые функции [18, 32]) и заключается в доставке ПК в ядро и передаче ее ядерным рецепторам, то вопрос о роли CRABP1 до сих пор остается открытым. Наиболее убедительной представляется гипотеза, согласно которой основная функция данного белка может быть связана с удержанием (секвестрированием) ПК в цитоплазме и тем самым временным ограничением ее активности. Такой гипотетический механизм является достаточно экономичным способом регуляции внутриклеточной активности ПК, позволяя «депонировать» ПК при ее избытке и использовать – при недостатке или повышении потребности. В этом смысле

функциональное значение белков CRABP1 и CRABP2 можно считать противоположным, что косвенно подтверждается некоторыми литературными данными [16, 33, 34]. Еще менее понятна роль белков CRABP в малигнизации клеток. Так, несмотря на то что участие обоих гомологов в канцерогенезе и опухолевой прогрессии показана во многих исследованиях [23, 30, 32, 35–37], данные о функциональном значении каждого из белков очень противоречивы [38]. Наконец, еще одним вопросом, особенно актуальным в контексте возможного использования ПК или других ретиноидов в терапии онкологических заболеваний, является вопрос об участии белков CRABP в формировании ПК-резистентности.

Ранее мы показали, что в опухолях, относящихся в целом к ПК-резистентным типам рака (немелкоклеточный рак легкого, глиобластома, рак яичника и др.), продукция белка CRABP1 практически отсутствует, в то время как в ПК-чувствительных опухолях (прежде всего нейробластома) CRABP1 экспрессируется на высоком уровне [29]. Более того, при сравнении клеток рака яичника с разной степенью ПК-резистентности оказалось, что максимально-резистентные линии OVCAR8, SK-OV-3 и EFO-21 характеризуются отсутствием

белка CRABP1, в то время как в менее устойчивых линиях OVCAR3 и OVCAR4 он детектируется на достаточно высоком уровне [39]. Исследование клеток РМЖ также показало, что в большинстве РК-чувствительных клеток продукция CRABP1 присутствовала, а в максимально-резистентных – отсутствовала [29]. Все это указывает на связь CRABP1 с РК-чувствительностью.

В данной работе с использованием той же панели клеточных линий РМЖ мы проанализировали возможную связь экспрессии мРНК *CRABP1* с РК-чувствительностью и выяснили, что картина сильно сложнее и связана с различным уровнем репрессии (легко обратимой и практически необратимой) *CRABP1*. Действительно, в максимально-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ экспрессия мРНК *CRABP1* практически отсутствует, причем она не возрастает при обработке деметилирующим агентом и почти не меняется при ацетилировании гистонов, т.е. в этих клетках происходит глубокая репрессия транскрипции. Интересно, что в клетках HBL100 экспрессия восстанавливается при обработке комбинацией DAC + TSA, причем такое сочетание приводит к увеличению уровня мРНК практически на 2 порядка. Это может означать, что в данной линии клеток в подавлении транскрипции *CRABP1* задействованы оба механизма – метилирование гена *CRABP1* и деацетилирование гистонов. Соответственно, при инкубации с обоими реагентами деконденсация хроматина открывает доступ деметилазам, после чего экспрессия может восстанавливаться. Но даже и в этом случае продукция белка CRABP1 не восстанавливается, что означает, что в клетках HBL100 присутствует дополнительная блокировка экспрессии *CRABP1* на посттранскрипционном уровне (трансляционном или посттрансляционном). Об этом же свидетельствуют и результаты экзогенной экспрессии *CRABP2* в данной линии – трансдукция гена привела к увеличению уровня мРНК *CRABP2* на 2 порядка, однако белок по-прежнему не детектировался. Возможно, это также связано с наличием механизма, блокирующего продукцию гомологов CRABP. В другой максимально-резистентной линии, MDA-MB-231, экспрессия мРНК не восстанавливается даже при сочетании DAC + TSA, это говорит о том, что в данных клетках эпигенетическая репрессия осуществляется на еще более глубоком транскрипционном уровне. Таким образом, в максимально-резистентных клетках происходит глубокая и, по-видимому, необратимая репрессия экспрессии мРНК, осуществляемая

с помощью нескольких механизмов регуляции на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях.

Согласно нашей гипотезе, опухолевым клеткам, чувствительным к РК, белок CRABP1 необходим для защиты от рост-ингибирующей активности РК, причем они могут либо экспрессировать CRABP1 изначально, либо индуцировать экспрессию при увеличении внутриклеточной концентрации РК, в то время как полностью РК-резистентным клеткам активность CRABP1 становится не актуальной, поскольку им не угрожает избыток РК – он не приведет к подавлению их роста. В пользу этой гипотезы свидетельствуют полученные результаты деметилирования ДНК, которые показали, что в РК-чувствительных клетках, в отличие от РК-резистентных, происходит восстановление экспрессии CRABP1. В средне-резистентных клетках увеличения экспрессии не происходит (по-видимому, за счет исходно высокого уровня и отсутствия метилирования), а в максимально-резистентных клетках происходит глубокая репрессия *CRABP1*, осуществляемая на разных уровнях эпигенетической регуляции. Следует отметить, что в РК-чувствительных клетках регуляция экспрессии CRABP1 тоже различается. Так, в клетках SKBR3 исходно низкий уровень белка соответствует низкому уровню мРНК, и обе характеристики возрастают в результате деметилирования. Другая высокочувствительная линия, T47D, демонстрирует относительно высокий уровень экспрессии CRABP1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка, в связи с чем, по-видимому, слабо индуцирует экспрессию при обработке деметилирующим агентом. В то же время в обеих средне-чувствительных линиях, MCF7 и HCC1954, наблюдается иная картина – при высоком уровне белка мРНК детектируется на крайне низком уровне. Такой странный результат можно объяснить низкой стабильностью мРНК в сочетании с высоким периодом полужизни белка, что, в свою очередь, может вызываться низким уровнем протеолитической деградации и другими причинами. В этой связи крайне интересными представляются результаты исследования структурно-функциональных особенностей белков семейства iBP. В частности, для CRABP1 (и только для него) показано, что данный белок вследствие особенностей своей структуры подвержен агрегации («Aggregation propensity») – необратимому процессу, в ходе которого белок становится неактивным. Агрегация связана с так называемым «открытым состоянием» структуры белка («open state»), обеспечивающим

связывание РК. Более того, различные мутации способствуют такому фолдингу и увеличивают срок пребывания белка в данной конформации [40–43]. Таким образом, РК-чувствительные клетки «используют» различные методы для регуляции уровня белка CRABP1 и возможности быстрой индукции его экспрессии. Регуляция внутриклеточного уровня CRABP1 в РК-чувствительных клетках может осуществляться и за счет его секреции в экстраклеточные везикулы. Так, согласно нашим (пока неопубликованным) данным, CRABP1 обнаруживается в составе малых экстраклеточных везикул, секретируемых РК-чувствительными клетками РМЖ.

Мы также подтвердили показанные нами ранее данные о том, что экспрессия двух гомологов коррелирует между собой на уровне белка в клетках РМЖ [29], более того, эта корреляция имеет место и в тканях первичных опухолей, причем как на уровне мРНК, так и на уровне белка, что было показано нами ранее для немелкоклеточного рака легких. Примечательно то, что эта корреляция утрачивается в ходе опухолевой прогрессии на поздних стадиях заболевания [22]. Ранее мы также показали, что продукция CRABP1 и CRABP2 взаимосвязаны, причем CRABP2 является «upstream» регулятором CRABP1 [29].

Для ответа на вопрос о функциональном значении белков CRABP в РК-чувствительности/резистентности и малигнизации клеток мы далее провели исследование по направленной модификации экспрессии каждого из гомологов в линиях клеток РМЖ с исходно разным уровнем РК-чувствительности. Для исследования были выбраны по 2 линии из категории РК-чувствительных, средне-резистентных и максимально-резистентных. Суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы: а) CRABP1 и CRABP2 не влияют на обе исследуемые характеристики максимально-резистентных клеток; б) во всех остальных линиях CRABP1 и CRABP2 оказывают противонаправленный эффект в отношении обеих характеристик (сами характеристики меняются сонаправленно); в) направление этого влияния является противоположным в РК-чувствительных и РК-резистентных клетках.

Такие результаты являются достаточно неожиданными, однако в действительности хорошо укладываются в указанную выше концепцию, а также объясняют противоречия, имеющиеся в литературе. Так, несмотря на то что CRABP2 принято считать, скорее, супрессором опухолевого роста [32, 44, 45], есть масса примеров противоположной роли данно-

го белка в опухолевой прогрессии [18, 19, 21]. Хотя роль CRABP1 исследована значительно меньше, согласно нашим и некоторым литературным данным, он играет роль промотора опухолей [23, 30, 46]. Вместе с тем в клетках нейробластомы (наиболее РК-чувствительном типе опухолей), согласно нашим данным, экспрессия CRABP1 коррелирует с высокой степенью дифференцировки [47], которая, в свою очередь, связана с благоприятным прогнозом. Есть и ряд других данных, свидетельствующих в пользу роли CRABP1 как супрессора роста опухолей [48, 49]. Эти на первый взгляд противоречивые данные во многом связаны с тем, что в подавляющем большинстве работ проводилось исследование одного из белков CRABP, в то время как совместное «поведение» двух гомологов почти не исследовалось. Основным исключением является работа Liu et al. [16], в которой впервые было сделано предположение о противоположной функции белков CRABP1 и CRABP2 в прогрессии РМЖ. Авторы работы предположили, что CRABP1 ограничивает доступ CRABP2 к РК и препятствует проведению CRABP2-зависимого сигналинга в реализации дифференцировочной и про-апоптотической функции РК. Авторы связывают этот эффект с той же активностью CRABP1 – секвестрированием РК в цитоплазме. Результаты нашей работы хорошо укладываются в такую гипотезу, напрямую подтверждая такое предположение для каждого из гомологов в случае РК-чувствительных клеток. Однако как может объясняться тот факт, что в РК-резистентных клетках при сохранении противоположной роли белков CRABP1 и CRABP2 направленность этой роли (т.е. функциональное значение каждого из гомологов) меняется на обратную? Согласно некоторым данным, разные РК-связывающие белки направляют РК к разным ее ядерным рецепторам. Так, CRABP2 передает РК преимущественно рецепторам RAR, прежде всего, RAR α , в то время как FABP5 преимущественно доставляет РК рецепторам PPAR, прежде всего PPAR δ [7]. Предполагается, что передача РК по пути CRABP2/RAR α приводит к РК-зависимой активации транскрипции ретиноид-респонсивных генов с дифференцировочной, проапоптотической и антипролиферативной активностью, в то время как активация каскада РК/FABP5/PPAR δ оказывает противоположный эффект [50, 51]. В связи с тем, что устройство ретиноевого сигналинга до сих пор исследовано недостаточно, остается непонятным, насколько это универсальная закономерность и способны ли указанные РК-связывающие белки передавать РК

«чужим» рецепторам (например, CRABP2 – рецепторам PPAR). Также непонятно, от чего зависит то, какой именно путь доминирует в клетках. Авторы приведенной гипотезы предполагают, что это обусловлено соотношением уровней экспрессии РК-связывающих белков и соотношением экспрессии ядерных рецепторов РК [7]. В этом контексте можно предположить, что смена функциональной роли CRABP2 в РК-резистентных клетках связана с изменением РК-зависимого сигналинга, при котором активность данного белка приводит к активации транскрипции генов промоторов опухолей (антиапоптотических, пролиферативных и пр.). Это, в свою очередь, может быть вызвано изменением соотношения ядерных рецепторов РК. Такую гипотезу подтверждают наши недавно опубликованные данные, согласно которым в рамках панели тех же исследуемых линий РМЖ имеет место достоверная и сильная корреляция РК-чувствительности клеток с уровнем экспрессии RAR α [52]. В совокупности с представленными здесь результатами это означает, что в РК-чувствительных клетках наблюдается «классическая» картина РК-зависимого сигналинга, при которой CRABP2 передает РК рецепторам RAR α , что, в свою очередь, приводит к активации транскрипции генов супрессоров опухолей. Соответственно, снижение продукции данного белка способствует увеличению пролиферации и уровню малигнизации клеток. По мере опухолевой прогрессии происходит увеличение РК-резистентности, связанное со снижением экспрессии RAR α и, предположительно, с активацией других рецепторов РК. В таких клетках осуществляемый белком CRABP2 транспорт РК приводит к активации альтернативных рецепторов и стимуляции транскрипции генов промоторов опухолей.

Другая возможная причина смены функционального значения CRABP2 может быть связана с различиями в гормональном статусе клеток. Возможно, что в клетках трижды-негативного РМЖ CRABP2 выполняет роль промотора опухолей. О такой возможности (разной роли CRABP2 в клетках с разным гормональным статусом) свидетельствуют и некоторые литературные данные [21].

Что же касается CRABP1, то его роль, по сути, не меняется и является, по-видимому, «вторичной» по отношению к CRABP2: ограничение активности РК за счет удерживания ее в цитоплазме и функциональное «противодействие» CRABP2. Соответственно, в РК-чувствительных клетках CRABP1 препятствует противоопухолевой активности CRABP2 и сни-

жает чувствительность к CRABP2-опосредуемой транскрипционной активности РК, а в более резистентных клетках, в которых CRABP2 выполняет роль промотора опухолей, CRABP1 становится «супрессором». При этом максимальная РК-резистентность сопровождается полной репрессией ретиноевого сигналинга (либо реализуется за счет других РК-связывающих белков), а экзогенная экспрессия каждого из белков не вызывает изменений исследуемых характеристик. Более того, ранее показанная нами как для РК-чувствительных, так и для средне-резистентных клеток CRABP2-зависимая регуляция экспрессии CRABP1 утрачивается [29], поскольку гиперэкспрессия CRABP2 не приводит к увеличению продукции CRABP1. Эти данные согласуются с данными нашей цитируемой выше статьи, где была показана потеря корреляции экспрессии CRABP1 и CRABP2 в тканях немелкоклеточного рака легкого на поздних стадиях опухолевой прогрессии [22].

Согласно нашей гипотетической модели (представлена на схеме, рис. 6), в РК-чувствительных клетках РМЖ CRABP2 обладает супрессорной, а CRABP1 – промоторной активностью в отношении опухолевого роста, при этом белки связаны между собой на уровне экспрессии (CRABP2 активирует CRABP1); функционально CRABP1 препятствует CRABP2 в проведении РК-сигналинга, предположительно, за счет секвестрирования РК в цитоплазме. При этом CRABP1 характеризуется тем или иным уровнем метилирования промотора, что может означать «готовность» РК-чувствительных клеток к защите от РК в случае ее избытка. Эти клетки также способны экскретировать белок CRABP1 в составе малых внеклеточных везикул, что, с одной стороны, может использоваться клетками для регулирования внутриклеточного количества белка; с другой стороны, с учетом показанной здесь рост-стимулирующей активности, может способствовать росту клеток микроокружения. В средне-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ функциональное значение белков CRABP меняется на противоположное: CRABP2 обладает промоторной, а CRABP1 – супрессорной активностью в отношении опухолей, при этом сохраняется CRABP2-зависимая регуляция экспрессии CRABP1 [29] и противоположная роль гомологов в проведении РК-сигналинга. Экспрессия на уровне мРНК CRABP2 и CRABP1 максимальная, метилирование гена CRABP1 – минимально. В максимально-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ продукция белков CRABP не детектируется, транскрипция CRABP1 репрес-

сируется на нескольких уровнях. Взаимосвязь экспрессии белков CRABP и их функциональное значение в опухолевой прогрессии и РК-чувствительности утрачиваются.

Вклад авторов. А.Д. Еникеев – получение экспериментальных данных, анализ литературы, написание статьи; П.М. Абрамов, Д.С. Елкин, А.В. Комельков, А.А. Беляева, Д.М. Силантьева – получение экспериментальных данных, Е.М. Чевкина – дизайн исследования, анализ результатов, редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00373).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yilmaz, M., Kantarjian, H., and Ravandi, F. (2021) Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms, *Blood Cancer J.*, **11**, 123, doi: 10.1038/s41408-021-00514-3.
2. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan, C., and Berlin Grace, V. M. (2011) All *trans* retinoic acid and cancer, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **33**, 241-249, doi: 10.3109/08923973.2010.521507.
3. Choi, Y., Kim, S. Y., Kim, S. H., Yang, J., Park, K., and Byun, Y. (2003) Inhibition of tumor growth by biodegradable microspheres containing all-*trans*-retinoic acid in a human head-and-neck cancer xenograft, *Int. J. Cancer*, **107**, 145-148, doi: 10.1002/ijc.11354.
4. Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., and Maurer, B. J. (2003) Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma, *Cancer Lett.*, **197**, 185-192, doi: 10.1016/S0304-3835(03)00108-3.
5. David, M., Hodak, E., and Lowe, N. J. (1988) Adverse effects of retinoids, *Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.*, **3**, 273-288, doi: 10.1007/BF03259940.
6. Campos, B., Weisang, S., Osswald, F., Ali, R., Sedlmeier, G., Bageritz, J., Mallm, J. P., Hartmann, C., von Deimling, A., Popanda, O., Goidts, V., Plass, C., Unterberg, A., Schmezer, P., Burhenne, J., and Herold-Mende, C. (2015) Retinoid resistance and multifaceted impairment of retinoic acid synthesis in glioblastoma, *Glia*, **63**, 1850-1859, doi: 10.1002/glia.22849.
7. Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N., and Noy, N. (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors, *Cell*, **129**, 723-733, doi: 10.1016/j.cell.2007.02.050.
8. Veerkamp, J. H., and Maatman, R. G. (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes, *Prog. Lipid Res.*, **34**, 17-52, doi: 10.1016/0163-7827(94)00005-7.
9. Dong, D., Ruuska, S. E., Levinthal, D. J., and Noy, N. (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid, *J. Biol. Chem.*, **274**, 23695-23698, doi: 10.1074/JBC.274.34.23695.
10. Jing, Y., Waxman, S., and Mira-y-Lopez, R. (1997) The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells, *Cancer Res.*, **57**, 1668-1672.
11. Tang, X.-H., Vivero, M., and Gudas, L. J. (2008) Overexpression of CRABP1 in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-*trans* retinoic acid, *Exp. Cell Res.*, **314**, 38-51, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.016.
12. Persaud, S. D., Lin, Y. W., Wu, C. Y., Kagechika, H., and Wei, L. N. (2013) Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-*trans* retinoic acid, *Cell. Signalling*, **25**, 19-25, doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.002.
13. Boylan, J. F., and Gudas, L. J. (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-*trans*-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 21486-21491, doi: 10.1016/s0021-9258(19)36635-9.
14. Napoli, J. L. (1999) Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 139-162, doi: 10.1016/S1388-1981(99)00117-1.
15. Boylan, J. F., and Gudas, L. J. (1991) Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells, *J. Cell Biol.*, **112**, 965-979, doi: 10.1083/jcb.112.5.965.
16. Liu, R. Z., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Poon, H. Y., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2015) CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid, *Mol. Cancer*, **14**, 129, doi: 10.1186/s12943-015-0380-7.
17. Yang, Q., Wang, R., Xiao, W., Sun, F., Yuan, H., and Pan, Q. (2016) Cellular retinoic acid binding protein 2

- is strikingly downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor, *PLoS One*, **11**, e0148381, doi: 10.1371/journal.pone.0148381.
18. Gupta, A., Williams, B. R. G., Hanash, S. M., and Rawwas, J. (2006) Cellular retinoic acid-binding protein II is a direct transcriptional target of MycN in neuroblastoma, *Cancer Res.*, **66**, 8100-8108, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4519.
 19. Liu, R. Z., Li, S., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Yin Poon, H., Easaw, J. C., and Godbout, R. (2016) Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma, *Glia*, **64**, 963-976, doi: 10.1002/glia.22976.
 20. Chen, Q., Tan, L., Jin, Z., Liu, Y., and Zhang, Z. (2020) Downregulation of CRABP2 inhibit the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*, *BioMed Res. Int.*, **2020**, 3098327, doi: 10.1155/2020/3098327.
 21. Feng, X., Zhang, M., Wang, B., Zhou, C., Mu, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Y., Song, Z., and Liu, P. (2019) CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 361, doi: 10.1186/s13046-019-1345-2.
 22. Favorskaya, I., Kainov, Y., Chemeris, G., Komelkov, A., Zborovskaya, I., and Tchevkina, E. (2014) Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer, *Tumor Biol.*, **35**, 10295-10300, doi: 10.1007/s13277-014-2348-4.
 23. Lu, Y., Lemon, W., Liu, P. Y., Yi, Y., Morrison, C., Yang, P., Sun, Z., Szoke, J., Gerald, W. L., Watson, M., Govindan, R., and You, M. (2006) A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer, *PLoS Med.*, **3**, 2229-2243, doi: 10.1371/journal.pmed.0030467.
 24. Hawthorn, L., Stein, L., Varma, R., Wiseman, S., Loree, T., and Tan, D. F. (2004) TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma, *Head Neck*, **26**, 1069-1083, doi: 10.1002/hed.20099.
 25. Tanaka, K., Imoto, I., Inoue, J., Kozaki, K., Tsuda, H., Shimada, Y., Aiko, S., Yoshizumi, Y., Iwai, T., Kawano, T., and Inazawa, J. (2007) Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma, *Oncogene*, **26**, 6456-6468, doi: 10.1038/sj.onc.1210459.
 26. Huang, Y., De la Chapelle, A., and Pellegata, N. S. (2003) Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma, *Int. J. Cancer*, **104**, 735-744, doi: 10.1002/ijc.11006.
 27. Blaese, M. A., Santo-Hoeltje, L., and Rodemann, H. P. (2003) CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **79**, 981-991, doi: 10.1080/09553000310001632949.
 28. Choi, W.-S., Liu, R.-Z., and Godbout, R. (2021) Abstract 1401: MYC mediates retinoic acid resistance by suppressing cellular retinoic acid-binding protein (CRABP2) transcription in HER2-enriched breast cancers, *Cancer Res.*, **81**, 1401-1401, doi: 10.1158/1538-7445.am2021-1401.
 29. Enikeev, A. D., Komelkov, A. V., Axelrod, M. E., Galetsky, S. A., Kuzmichev, S. A., and Tchevkina, E. M. (2021) CRABP1 and CRABP2 protein levels correlate with each other but do not correlate with sensitivity of breast cancer cells to retinoic acid, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 217-229, doi: 10.1134/S0006297921020103.
 30. Kainov, Y., Favorskaya, I., Delektorskaya, V., Chemeris, G., Komelkov, A., Zhuravskaya, A., Trukhanova, L., Zueva, E., Tavitian, B., Dyakova, N., Zborovskaya, I., and Tchevkina, E. (2014) CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors, *Cell Cycle*, **13**, 1530-1539, doi: 10.4161/cc.28475.
 31. Enikeev, A. D., Komelkov, A. V., Axelrod, M. E., Galetsky, S. A., and Tchevkina, E. M. (2020) Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin, *Usp. Mol. Oncol.*, **7**, 46-50, doi: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-46-50.
 32. Vreeland, A. C., Levi, L., Zhang, W., Berry, D. C., and Noy, N. (2014) Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **289**, 34065-34073, doi: 10.1074/jbc.M114.604041.
 33. Chen, A. C., Yu, K., Lane, M. A., and Gudas, L. J. (2003) Homozygous deletion of the CRABP1 gene in AB1 embryonic stem cells results in increased CRABP2 gene expression and decreased intracellular retinoic acid concentration, *Arch. Biochem. Biophys.*, **411**, 159-173, doi: 10.1016/S0003-9861(02)00732-4.
 34. Vaessen, M. J., Meijers, J. H. C., Bootsma, D., and Van Kessel, G. (1990) The cellular retinoic-acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic-acid-induced malformations, *Development*, **110**, 371-378, doi: 10.1242/dev.110.2.371.
 35. Perez-Castro, A. V., Tran, V. T., and Nguyen-Huu, M. C. (1993) Defective lens fiber differentiation and pancreatic tumorigenesis caused by ectopic expression of the cellular retinoic acid-binding protein I, *Development*, **119**, 363-375, doi: 10.1242/dev.119.2.363.
 36. Pavone, M. E., Reierstad, S., Sun, H., Milad, M., Bulun, S. E., and Cheng, Y. H. (2010) Altered retinoid uptake and action contributes to cell survival in endometriosis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, E300-E309, doi: 10.1210/jc.2010-0459.
 37. Zhang, W., Levi, L., Banerjee, P., Jain, M., and Noy, N. (2015) Kruppel-like factor 2 suppresses

- mammary carcinoma growth by regulating retinoic acid signaling, *Oncotarget*, **6**, 35830-35842, doi: 10.18632/oncotarget.5767.
38. Tchekina, E. M. (2017) Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther. Oncol. Int. J.*, **8**, 555733, doi: 10.19080/ctoj.2017.08.555733.
 39. Еникеев А. Д., Комельков А. В., Беляева А. А., Галецкий С. А., Чевкина Е. М. (2023) Экспрессия белка CRABP1 связана с уровнем резистентности к ретиноевой кислоте клеток злокачественных опухолей различного происхождения, *Рецепторы Внутриклет. Сигнал.*, **2**, 668-675.
 40. Budyak, I. L., Krishnan, B., Marcelino-Cruz, A. M., Ferrolino, M. C., Zhuravleva, A., and Gierasch, L. M. (2013) Early folding events protect aggregation-prone regions of a β -rich protein, *Structure*, **21**, 476-485, doi: 10.1016/j.str.2013.01.013.
 41. Ferrolino, M. C., Zhuravleva, A., Budyak, I. L., Krishnan, B., and Gierasch, L. M. (2013) Delicate balance between functionally required flexibility and aggregation risk in a β -rich protein, *Biochemistry*, **52**, 8843-8854, doi: 10.1021/bi4013462.
 42. Ignatova, Z., and Gierasch, L. M. (2004) Monitoring protein stability and aggregation *in vivo* by real-time fluorescent labeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 523-528, doi: 10.1073/pnas.0304533101.
 43. Thakur, A. K., Meng, W., and Gierasch, L. M. (2018) Local and non-local topological information in the denatured state ensemble of a β -barrel protein, *Protein Sci.*, **27**, 2062-2072, doi: 10.1002/pro.3516.
 44. Donato, L. J., Suh, J. H., and Noy, N. (2007) Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling, *Cancer Res.*, **67**, 609-615, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0989.
 45. Vreeland, A. C., Yu, S., Levi, L., de Barros Rossetto, D., and Noy, N. (2014) Transcript stabilization by the RNA-binding protein HuR is regulated by cellular retinoic acid-binding protein 2, *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 2135-2146, doi: 10.1128/mcb.00281-14.
 46. Делекторская В. В., Чемерис Г. Ю., Каинов Я. А., Козлов Н. А., Зборовская И. Б. (2013) Экспрессия белка, связывающего ретиноевую кислоту, и пролиферативная активность клеток в нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы, *Мол. Мед.*, **2013**, 38-43.
 47. Строганова А. М., Чемерис Г. Ю., Чевкина Е. М., Сендерович А. И., Карселадзе А. И. (2016) Белок CRABP1 и его роль в процессе дифференцировки нейробластомы, *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина МЗ РФ*, **27**, 157-164.
 48. Celestino, R., Nome, T., Pestana, A., Hoff, A. M., Gonçalves, A. P., Pereira, L., Cavadas, B., Eloy, C., Bjørø, T., Sobrinho-Simões, M., Skotheim, R. I., and Soares, P. (2018) CRABP1, C1QL1 and LCN2 are biomarkers of differentiated thyroid carcinoma, and predict extrathyroidal extension, *BMC Cancer*, **18**, 68, doi: 10.1186/s12885-017-3948-3.
 49. Ahlquist, T., Lind, G. E., Costa, V. L., Meling, G. I., Vatn, M., Hoff, G. S., Rognum, T. O., Skotheim, R. I., Thiis-Evensen, E., and Lothe, R. A. (2008) Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers, *Mol. Cancer*, **7**, 94, doi: 10.1186/1476-4598-7-94.
 50. Noy, N., Morgan, E., and Kannan-Thulasiraman, P. (2010) Involvement of fatty acid binding protein 5 and PPAR β/δ in prostate cancer cell growth, *PPAR Res.*, **2010**, 234629, doi: 10.1155/2010/234629.
 51. Levi, L., Lobo, G., Doud, M. K., Von Lintig, J., Seachrist, D., Tochtrop, G. P., and Noy, N. (2013) Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis, *Cancer Res.*, **73**, 4770-4780, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0384.
 52. Еникеев, А. Д., Комельков, А. В., Елкина, Н. В., Аксельрод, М. Е., Кузмичев, С. А., и Чевкина, Е. М. (2022) Resistance of breast cancer cells to all-*trans* retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor RAR α expression and induction of cytochrome CYP26A1 and CYP26B1 expression, *Usp. Mol. Oncol.*, **9**, 66-78, doi: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78.

OPPOSING EFFECTS OF CRABP1 AND CRABP2 HOMOLOGS ON THE PROLIFERATION OF BREAST CANCER CELLS AND THEIR SENSITIVITY TO RETINOIC ACID

**A. D. Enikeev¹, P. M. Abramov¹, D. S. Elkin¹, A. V. Komelkov¹, A. A. Belyaeva¹,
D. M. Sylantieva², and E. M. Tchekina^{1*}**

¹ *N.N. Blokhin National Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russian Federation, 115522 Moscow, Russia; e-mail: tchekina@mail.ru*

² *Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia*

Resistance of tumor cells to retinoic acid (RA), a promising therapeutic agent, is the major factor limiting the use of RA in clinical practice. The mechanisms of RA resistance are still poorly understood. Cellular Retinoic Acid Binding Proteins, CRABP1 and CRABP2, are essential mediators of RA signaling, but the role of the two CRABP homologs in regulating cellular sensitivity to RA has not been well studied. In addition, the effects of CRABP1 and CRABP2 on cell proliferation have not been compared. Here, using a broad panel of breast cancer cell lines with different levels of RA sensitivity/resistance, we show for the first time that in RA-sensitive cells, CRABP1 expression is restricted by methylation and protein levels are highly variable. In moderately RA-resistant lines, a high level of CRABP1 is observed both at the mRNA and protein levels, unchanged by inhibition of DNA methylation. The maximally resistant cell lines are characterized by complete repression of CRABP1 implemented at transcriptional and posttranscriptional levels, and exogenous expression of each of CRABP homologs has no effect on the studied characteristics. CRABP1 and CRABP2 proteins have opposing effects on proliferation and sensitivity to RA. Specifically, in initially RA-sensitive cells CRABP1 stimulates and CRABP2 reduces proliferation and resistance to RA, while in more resistant cells the role of each homolog in both of these indications is reversed. Overall, we have shown for the first time that CRABP proteins exert different effects on the growth and sensitivity to RA of breast cancer cells (stimulation, suppression, or no effect) depending on the baseline level of RA-sensitivity, with the effects of CRABP1 and CRABP2 homologs on the studied properties always being opposite.

Keywords: retinoic acid, ATRA, CRABP1, CRABP2, proliferation, RA-resistance, breast cancer

ДИКАРБОНИЛ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОПРОТЕИДЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ – КЛЮЧЕВЫЕ ИНДУКТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *LOX-1* И *NOX1* В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 В.З. Ланкин¹, М.Г. Шарпов^{2*}, А.К. Тихазе¹, Р.Г. Гончаров²,
О.А. Антонова¹, Г.Г. Коновалова¹, В.И. Новоселов²

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России,
121552 Москва, Россия

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биофизики клетки РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: sharпов.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.08.2023

После доработки 24.09.2023

Принята к публикации 26.09.2023

Впервые исследована экспрессия генов *LOX-1* (лектин-подобного рецептора-1 для окисленных липопротеидов низкой плотности) и *NOX1* (NADPH-оксидазы 1) в эндотелиоцитах пупочной вены человека (HUVESs) при культивировании в присутствии липопротеидов низкой плотности (ЛНП), модифицированных различными природными дикарбонилами. Установлено, что из исследованных дикарбонил-модифицированных ЛНП (модифицированные малоновым диальдегидом (МДА) ЛНП, глиоксаль-модифицированные ЛНП и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП) наибольшую индукцию генов *LOX-1* и *NOX1*, а также генов антиоксидантных ферментов и проапоптотических факторов в HUVESs вызывают МДА-модифицированные ЛНП. Обсуждается важная роль дикарбонил-модифицированных ЛНП в молекулярных механизмах повреждения стенки сосудов и дисфункции эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липопротеиды низкой плотности (ЛНП), дикарбонил-модифицированные ЛНП, экспрессия генов *LOX-1* и *NOX1*, молекулярные механизмы атерогенеза и диабетогенеза.

DOI: 10.31857/S0320972523120138, EDN: NQUATF

ВВЕДЕНИЕ

Гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), например, при ишемии/реперфузии органов, сопровождается иницированием свободнорадикальных процессов, приводящих к развитию окислительного стресса [1]. Окислительный стресс играет важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза [2–4], причем накопление первичных молекулярных продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов – липогидропероксидов (ЛООН) – в процессе окислительного стресса [5, 6] вызывает последующее резкое увеличение вторичных молекулярных продук-

тов окислительной деструкции ЛООН – природных низкомолекулярных дикарбониллов, таких как 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид (МДА) [5, 6]. Таким образом, окислительный стресс неизбежно переходит в карбонильный стресс, характеризующийся накоплением активных карбонильных соединений (АКС) [5, 6]. Карбонильный стресс сопровождается развитием сахарного диабета [4–6], но накопление АКС в этом случае происходит вследствие автоокисления и ферментативного окисления глюкозы [4–6], а также при атаке глюкозы или ее производных пероксильными радикалами липидов [7, 8]. АКС, образующиеся при окислительном и карбонильном стрессе,

Принятые сокращения: АКС – активные карбонильные соединения; АФК – активные формы кислорода; ГЛ – глиоксаль; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; МГЛ – метилглиоксаль; МДА – малоновый диальдегид; CAT (*CAT*) – каталаза; GPx (*GPX*) – глутатионпероксидазы; HUVESs – культивируемые эндотелиоциты пупочной вены человека; *LOX-1* (*LOX-1*, *OLR1*) – лектин-подобный рецептор-1 для окисленных ЛНП; ЛООН – липогидропероксиды; *NOX1* (*NOX1*) – NADPH-оксидаза 1; Prdx (*PRDX*) – пероксиредоксины; SOD (*SOD*) – супероксиддисмутазы.

* Адресат для корреспонденции.

не только вызывают повреждение клеток стенки сосудов, но и провоцируют модификацию активного центра ключевых антиоксидантных ферментов [4–6, 9, 10], таких как супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GPx) и каталаза (CAT), утилизирующих (восстанавливающих) цитотоксичные АФК [11], что сопровождается ингибированием активности этих ферментов [4–6, 9]. При окислительном и карбонильном стрессе у больных атеросклерозом и сахарным диабетом в плазме крови происходит накопление окисленных ЛНП [4–6, 12–14], включая дикарбонил-модифицированные ЛНП [15, 16], а также значительное снижение активности SOD, GPx и CAT в эритроцитах [4–6, 9].

Эндотелиальные клетки имеют особую систему защитных ферментов, представленных преимущественно различными перокси-редоксинами (Prdx) [11, 17, 18], активность которых также подвержена ингибирующему действию АКС [18]. Поверхность эндотелиоцитов покрыта гликопротеидами, образующими гликокаликс [5, 6, 19], причем структура гликокаликса может подвергаться деструкции в процессе окислительного стресса [5, 6]. Согласно литературным данным, окисленные ЛНП индуцируют синтез лектин-подобного scavenger-рецептора-1 (LOX-1) на мембране эндотелиоцитов, который может играть важную роль в повреждении эндотелиальных клеток [5, 6, 20–23]. Окисленные ЛНП инициируют образование кислородных радикалов в эндотелии [24], вероятно, вследствие экспрессии NADPH-оксидазы (NOX), что стимулирует апоптоз эндотелиоцитов [5, 6, 24]. В то же время нами получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что scavenger-рецептор макрофагов связывается не с «окисленными» ЛНП (содержащими гидроперокси-производные в полиеновых ацилах наружного фосфолипидного слоя частиц ЛНП), а с частицами ЛНП, апопротеин В-100 которых химически модифицирован вследствие взаимодействия концевых NH₂-групп апобелка с альдегидными группами (Maillard reaction) [5–7] вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов, таких как МДА, или продуктов автоокисления/ферментативного окисления глюкозы, таких как глиоксаль (ГЛ) и метилглиоксаль (МГЛ) [25–27]. На основании приведенных данных нами была высказана гипотеза о том, что, вероятно, дикарбонил-модифицированные ЛНП, а не окисленные (LOOH-содержащие) ЛНП играют ключевую роль в развитии дисфункции эндотелия и атеросклеротическом повреждении стенки сосу-

дов [5, 6, 27]. Настоящая статья посвящена экспериментальной проверке этой гипотезы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVECs). Полость пупочной вены человека промывали в стерильных условиях раствором 1× PBS (1,7 мМ KH₂PO₄, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl, pH 7,4), заливали 0,15%-ным раствором диспазы («Sigma-Aldrich», США) в среде DMEM («Gibco», США) и инкубировали при 37 °С в течение 50 мин для ферментативной диссоциации клеток интимы пупочной вены. Клеточную суспензию осаждали при 800 g в течение 15 мин (центрифуга Eppendorf 5804R, Германия). Клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 20 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата Na, 50 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 200 мкг/мл фактора роста эндотелиальных клеток ECGF и 5 ед./мл гепарина (все компоненты производства «Gibco»). Клетки высевали в чашки Петри (плотность 3 × 10⁴ клеток на см²), покрытые 0,2%-ным раствором желатина («Sigma-Aldrich»), и культивировали при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ в инкубаторе INNOVA («New Brunswick Scientific», США). Ростовую среду меняли через 24 ч, а затем – каждые 48 ч. После того, как первичная культура достигала конфлюэнтного состояния (7–9 дней), клетки отмывали 0,05%-ным раствором трипсина («Gibco»), содержащим 0,02% ЭДТА («Sigma-Aldrich»), и культивировали в течение 2–3 пассажей [28].

Препаративное выделение ЛНП и химическая модификация их апопротеина В-100 природными дикарбонилами. Для выделения ЛНП использовали плазму крови здоровых доноров, которую приобретали в ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» (Москва). Выделение ЛНП проводили, как описано ранее [29], используя метод дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте NaBr (ультрацентрифуга Optima XPN-80 Beckman, ротор 70.1 Ti). Выделенные ЛНП диализовали при 4 °С в течение 18 ч против 2000 объемов 1× PBS при pH 7,4. Концентрацию белка в препарате ЛНП определяли по методу Лоури [30]. Для получения МДА-модифицированных ЛНП использовали свежеприготовленный раствор МДА, который получали

методом кислотного гидролиза 1,1,3,3-тетраэтоксипропана («Sigma-Aldrich») [31]. Концентрацию МДА определяли по поглощению при 267 нм на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu («Shimadzu», Япония), используя коэффициент молярной экстинкции $31\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [31]. Модификацию ЛНП дикарбонилами проводили путем инкубации препаратов ЛНП в течение 3 ч в темноте при 37 °С в присутствии свежеполученного МДА (см. выше), ГЛ или МГЛ (все реактивы фирмы «Sigma-Aldrich») при концентрации 1 мкМ дикарбонила/100 мкг белка ЛНП [31–33]. Эффективность модификации аминокислотных остатков белков (включая апопротеин В-100) при использованных концентрациях дикарбониллов, по литературным данным, составляет не менее 80–90% [31, 34]. Очистку ЛНП от избытка диальдегидов проводили при помощи диализа при 4 °С в течение 18 ч против 2000 объемов $1 \times \text{PBS}$ при pH 7,4 [31].

Культивирование HUVECs в присутствии ЛНП, модифицированных различными природными дикарбонилами. HUVECs подвергали воздействию нативных (не модифицированных) ЛНП и ЛНП, модифицированных различными природными дикарбонилами (МДА, ГЛ и МГЛ). Перед началом эксперимента HUVECs культивировали в 24-луночных планшетах до конfluence (1,5 × 10⁶ клеток на лунку) с 1 мл культуральной среды в атмосфере 21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂ в течение 24 ч при 37 °С в описанных выше условиях. После этого добавляли ростовую среду (900 мл) и растворы, содержащие 1 мг/мл ЛНП (100 мкл). В группе 1 (контроль, без ЛНП) к клеткам добавляли 100 мкл $1 \times \text{PBS}$; в группах 2–4 – по 100 мкл нативных (не модифицированных) ЛНП: МДА-модифицированных ЛНП, ГЛ-модифицированных ЛНП и МГЛ-модифицированных ЛНП соответственно. Все группы культивировали в идентичных условиях в течение 24 ч. Через 24 ч клетки снимали при добавлении раствора Трипсина-Версена («БиолоТ», Россия) и дважды промывали ростовой средой, осаждая их в центрифуге Eppendorf 5804R при 800 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл ростовой среды, содержащей 10% ДМСО, после чего клеточную суспензию замораживали и хранили при –80 °С до анализов [17, 28].

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК. Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью реагента ExtractRNA, согласно инструкции производителя («Евроген», Россия). Полученную тотальную РНК обрабатывали DNase I («New England Biolabs», США) для удаления

возможных примесей геномной ДНК. Целостность тотальной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии этидиум бромид (1 мкг/мл) по наличию полос рибосомальной РНК (28S и 18S). Концентрацию РНК оценивали по поглощению при 260 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 («ThermoFisher Scientific», США). Полученную РНК (2,5 мкг на реакцию) использовали для синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы MMLV и стандартного олигонуклеотида dT₁₅, следуя рекомендациям производителя («Евроген») [35].

ПЦР в реальном времени. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с ген-специфическими олигонуклеотидами (табл. 1).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в амплификаторе DTprime («ДНК-технология», Россия) с использованием набора qPCRmix-HS с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Евроген»). Режим ПЦР-РВ был следующий: (1) «горячий старт» (для исключения неспецифического отжига праймеров) при 95 °С – 3 мин; (2) денатурация при 95 °С – 15 с; (3) отжиг праймеров при 60 °С – 20 с; (4) синтез ДНК при 72 °С – 30 с + регистрация флуоресценции. Этапы 2–4 повторяли 40 раз. Определение значений порогового цикла C_t проводили с помощью программного обеспечения RealTime_PCR v.7.9 («ДНК-технология»). Нормирование данных проводили относительно гена цитоскелетного бета-актина (*ACTB*). Оценка изменения экспрессии генов проводили по методу 2^{-ddC_t} [36].

Иммуноблоттинг. Белки из клеток HUVECs выделяли с помощью лизирующего буфера: 25 mM Tris-HCl (pH 6,8), содержащий 50 mM DTT и 1% SDS. Общую концентрацию белка определяли методом Брэдфорда [37] по поглощению при 595 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop1000. Равные количества белка из образцов разделяли электрофорезом в 10%-ном SDS-PAGE по Леммли в вертикальной камере VE-10 («Хеликон», Россия). Затем проводили полусухой перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм Hybond-C («Amersham», США). Мембрану обратимо окрашивали 2%-ным раствором Ponceau S («Sigma-Aldrich») в 7%-ной уксусной кислоте и оценивали эффективность переноса белков из геля. Затем для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану отмывали от Ponceau S и инкубировали в буфере для гибридизации (5% бычьего сывороточного альбумина (BSA, «Amresco», США) в $1 \times \text{BS}$) в течение 16 ч при 4 °С.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для ПЦР-РВ

Гены	Номер гена в GenBank	Последовательность 5'→3'	Размер ампликона, п.н.
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	F: GGCATTGCTGACAGGATGCA R: TCCACATCTGCTGGAAGGTGGA	147
<i>PRDX1</i>	NM_001202431.1	F: CCACGGAGATCATTGCTTTCA R: AGGTGTATTGACCCATGCTAGAT	116
<i>PRDX2</i>	NM_005809.5	F: GAAGCTGTCTGGACTACAAAGG R: TCGGTGGGGCACACAAAAG	78
<i>PRDX3</i>	NM_006793.4	F: GAGACTACGGTGTGCTGTTAGA R: GTTGACGCTCAAATGCTTGATG	95
<i>PRDX4</i>	NM_006406.1	F: AGAGGAGTGCCACTTCTACG R: GGAAATCTTCGCTTTGCTTAGGT	103
<i>PRDX5</i>	NM_012094.4	F: CCCTGAGACGCTCAGCGGGCTATAT R: ACGCCCACTCTCCTTCACTGCA	96
<i>PRDX6</i>	NM_004905.2	F: GTTGCCACCCCAGTTGATTG R: TGAAGACTCCTTTCGGGAAAAGT	100
<i>SOD1</i>	NM_000454.4	F: CCATTGCATCATTGGCCGC R: AAACGACTTCCAGCGTTTCC	105
<i>SOD2</i>	NM_000636.3	F: TGGGGTTGGCTTGGTTTCAA R: GCAGTGGAATAAGGCCTGTTG	100
<i>SOD3</i>	NM_003102.2	F: CCTGCACTCGCGCTAACAG R: CACCTTTCAGCTCCTCCAAG	111
<i>CAT</i>	NM_001752.3	F: TGTTGCTGGAGAATCGGGTTC R: TCCCAGTTACCATCTTCTGTGTA	87
<i>GPX1</i>	NM_000581.2	F: CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG R: GAGGGACGCCACATTCTCG	105
<i>GPX3</i>	NM_002084.3	F: GAGCTTGCACCATTCGGTCT R: GGGTAGGAAGGATCTCTGAGTTC	94
<i>GPX4</i>	NM_002085.4	F: GAGGCAAGACCGAAGTAACTAC R: CCGAACTGGTTACACGGGAA	100
<i>GPX7</i>	NM_015696.4	F: CGCACCTACAGTGTCTCATTC R: CAGTACTTGAAGGCAGGATG	81
<i>GPX8</i>	NM_001008397.3	F: TACTTAGGGCTGAAGGAACTGC R: GGCTCCGATTCTCCAACTGA	92
<i>LOX-1 (OLR1)</i>	NM_001172632.1	F: TTCTCCTTTGATGCCCACTTATTT R: TTTTCCGCATAAACAGCTCCTC	105
<i>NOX1</i>	NM_001271815.2	F: ACATCGTGACAGGTCTGAAACA R: CTCCCACTACAGACTTGGGGT	102
<i>BAX</i>	NM_001291428.1	F: TGGAGCTGCAGAGGATGATTG R: GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAA	93
<i>CASP9</i>	NM_001229.4	F: CCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT R: ACTGCTCAAAGATGTCGTCCAG	90

Таблица 1 (окончание)

Гены	Номер гена в GenBank	Последовательность 5'→3'	Размер ампликона, п.н.
<i>CASP3</i>	NM_004346.3	F: CTGCCTCTTCCCCATTCTC R: CGCTTCCATGTATGATCTTTGGT	110
<i>TP53</i>	NM_000546.6	F: TTCACCCTTCAGATCCGTGG R: CTGGGCATCCTTGAGTTCCAA	81
<i>NFKB</i>	NM_001165412.1	F: CAAGGCAGCAAATAGACGAGC R: AAGCTGAGTTTGC GGAAGGA	82
<i>NFE2L2</i>	NM_001145412.3	F: AGGTTGCCACATTC CCAAA R: ACGTAGCCGAAGAACTCAT	108
<i>c-FOS</i>	NM_005252.4	F: TCTTACTACCACTCACCCGAGAC R: GGAATGAAGTTGGCACTGGAGAC	103
<i>c-JUN</i>	NM_002228.4	F: ACCAAGAAGTGCATGGACCTAACA R: GCTCAGCCTCGCTCTCACAA	178
<i>STAT3</i>	NM_003150.3	F: CGCACTTTAGATTCATTGATGCAG R: GTCAAAGGTGAGGGACTCAAAGT	90
<i>TLR2</i>	NM_003266.4	F: AGTTTGAAGTGCAGAAAAAGGTTGA R: GATGATGACCCCAAGACCC	81
<i>TLR4</i>	NM_003266.4	F: GAGCTTTAATCCCCTGAGGCA R: TTGTCTGGATTTACACCTGGA	95

Далее мембрану инкубировали в том же буфере для гибридизации с добавлением соответствующих первичных антител к цитоскелетному бета-актину (bAct) или к каспазе-3 («Cell Signaling Technology», США) в разведении, рекомендованном производителем (1 : 3000), в течение 18 ч при 4 °С. Затем мембрану трижды промывали буфером для отмывки (5%-ный БСА в 1× PBS, содержащий 0,1% (v/v) Tween 20) и инкубировали 1 ч при 37 °С в буфере со вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена («ИМТЭК», Россия), в разведении 1 : 5000. После промывки мембраны связавшиеся антитела детектировали с помощью диаминобензидина (DAB, «Amresco») [38]. Денситометрический анализ окрашенных мембран проводили с помощью программы ImageJ v.1.50 (National Institutes of Health, США).

Статистический анализ. Статистический анализ выполняли с использованием программ Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft», США) и SigmaPlot 11 («Systat Software Inc.», США). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость между отдельными экспериментальными группами определялась с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента.

Значение $p < 0,05$ принимали статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время можно считать установленным, что свободнорадикальное окисление ЛНП играет важную роль в индукции и прогрессировании атеросклероза [4–6, 26, 27]. Окислительная модификация частиц ЛНП может осуществляться как при накоплении липо-гидропероксидов в них (физическая модификация структуры ЛНП вследствие увеличения микровязкости фосфолипидного монослоя), так и при химической модификации апопротеина В-100 в процессе его взаимодействия со вторичным молекулярным продуктом липопероксидации – МДА [4–6, 26, 27]. Нами было экспериментально доказано, что при длительном Cu^{2+} -инициированном окислении ЛНП *in vitro*, так же как *in vivo*, образуются не только окисленные (ЛООН-содержащие) ЛНП, но и МДА-модифицированные ЛНП [27]. Литературные данные свидетельствуют, что ЛНП, окисленные при иницировании ионами Cu^{2+} , вызывают всплеск генерирования АФК и последующий апоптоз эндотелиоцитов как

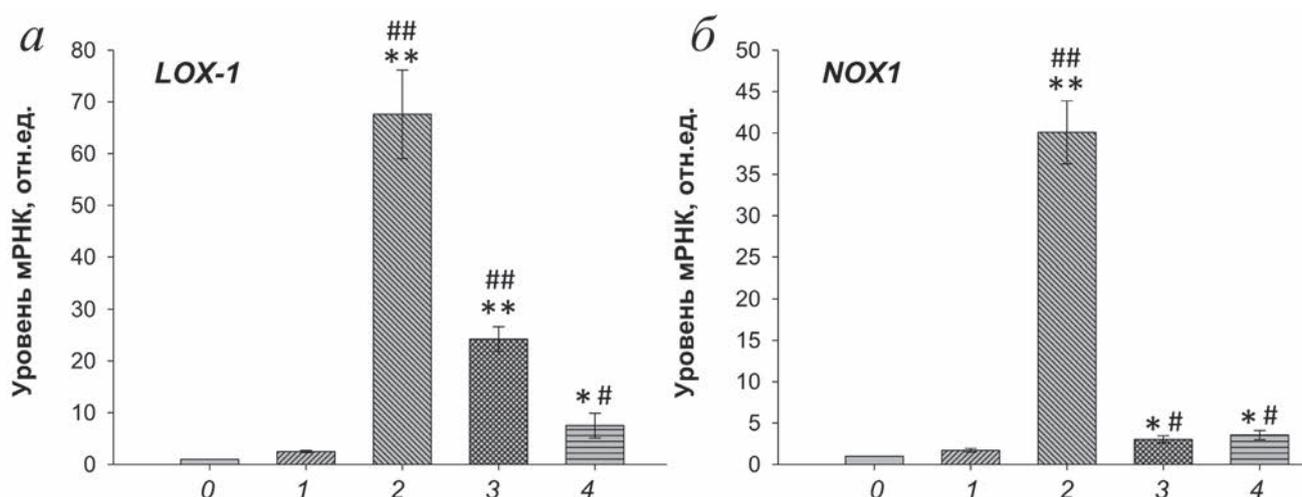


Рис. 1. Изменение уровня мРНК генов *LOX-1* (а) и *NOX1* (б) в клетках HUVECs при культивировании их без добавления ЛНП (контроль, 0), а также в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП (1), МДА-модифицированных ЛНП (2), ГЛ-модифицированных ЛНП (3) и МГЛ-модифицированных ЛНП (4). Изменения статистически достоверны относительно группы без ЛНП (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) и нативных ЛНП (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$)

в культуре HUVECs, так и в инкубируемых фрагментах аорты кролика [24]. В соответствии с этим было постулировано, что *LOX-1* является scavenger-рецептором «окисленных» ЛНП, которые по принципу обратной связи индуцируют его экспрессию, прежде всего, в эндотелиоцитах [20–23]. Индукция *LOX-1* сопровождается ростом экспрессии NADPH-оксидазы, которая является классическим продуцентом АФК, резкое увеличение образования которых приводит к стимуляции апоптоза эндотелиоцитов [5, 6, 20–23]. Таким образом, в литературе бытовало мнение, что именно «окисленные» ЛНП играют ведущую роль в повреждении эндотелиальных клеток и дисфункции эндотелия [5, 6, 20–23]. До настоящего времени влияние химически модифицированных ЛНП (дикарбонил-модифицированных ЛНП) на экспрессию генов *LOX-1* и *NOX1* в эндотелиоцитах не исследовалось. Тем не менее наши предшествующие работы указывали на то, что атерогенными (активно поглощаемыми культивируемыми макрофагами с образованием «пенистых» клеток) являются не LOOH-содержащие ЛНП (образованные при ферментативном окислении С-15 липоксигеназой), а частицы ЛНП, химически модифицированные МДА и другими дикарбонилами [5, 6, 25–27]. В связи с этим нами было высказано предположение, что не «окисленные» (LOOH-содержащие), а дикарбонил-модифицированные ЛНП являются ключевым фактором в молекулярных механизмах атеросклеротического повреждения стенки сосудов и дисфункции эндотелия [5, 6]. Экспериментальные данные, подтверждающие важную

роль дикарбонил-модифицированных ЛНП в развитии дисфункции эндотелия, приведены ниже.

Наиболее показательные результаты исследования приведены на рис. 1. Представленные данные свидетельствуют о том, что культивирование HUVECs в присутствии нативных ЛНП не оказывает существенного влияния на экспрессию генов *LOX-1* и *NOX1* (рис. 1, а и б), что соответствует ранее опубликованным данным [39, 40].

Различия в уровне мРНК *LOX-1* и *NOX1* в HUVECs при их культивировании в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП были незначительны по сравнению с соответствующими показателями в пробах без ЛНП (рис. 1, а и б). В то же время достоверное увеличение уровня мРНК *LOX-1* и *NOX1* в HUVECs было выявлено при культивировании эндотелиальных клеток в присутствии ЛНП, модифицированных всеми исследованными дикарбонилами: МДА, ГЛ и МГЛ (рис. 1, а и б). Наибольшие изменения уровня экспрессии *LOX-1* были обнаружены при действии МДА-модифицированных ЛНП (увеличение в 67 раз), тогда как ГЛ-модифицированные ЛНП и МГЛ-модифицированные ЛНП обладали значительно меньшим эффектом (увеличение в 24 и 8 раз соответственно) (см. рис. 1, б). Следует отметить, что, в соответствии с литературными данными [39], культивирование эндотелиоцитов аорты быка в течение 24 ч в присутствии «окисленных» ЛНП вызывало увеличение мРНК *LOX-1* не более чем в 5 раз, т.е. почти в 13 раз меньше, чем в проведенных нами аналогичных опытах

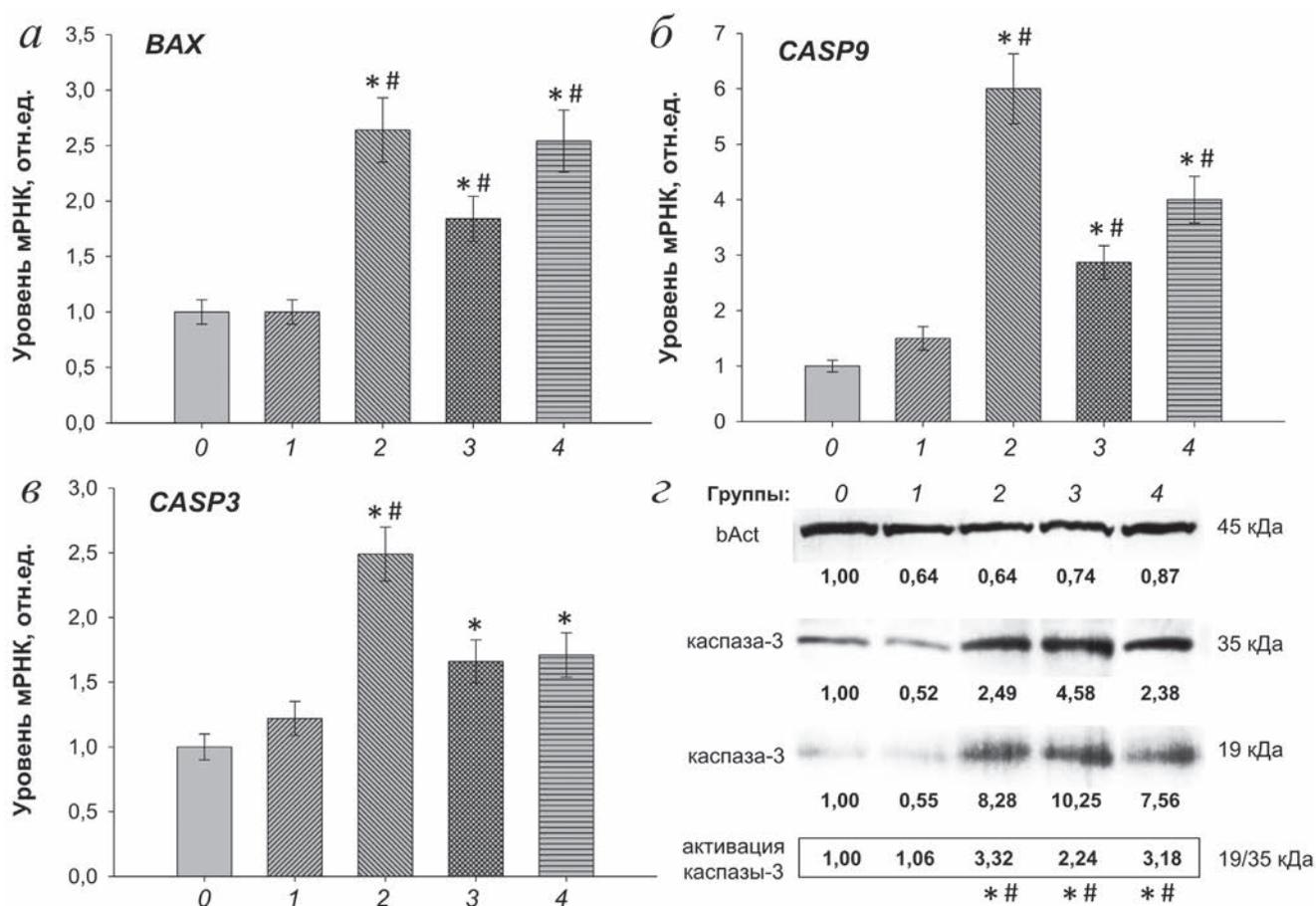


Рис. 2. Экспрессия генов маркеров апоптоза (*a* – ген *BAX*; *б* – ген *CASP9*; *в* – ген *CASP3*) в клетках HUVECs при культивировании их без добавления ЛНП (контроль, 0), а также в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП (1), МДА-модифицированных ЛНП (2), ГЛ-модифицированных ЛНП (3) и МГЛ-модифицированных ЛНП (4); *г* – оценка активации каспазы-3 из клеточных лизатов HUVECs с помощью иммуноблоттинга. Нормирование внутри групп проводили относительно цитоскелетного bAct. За 1 приняты значения уровня белков в интактных клетках HUVECs. Активацию каспазы-3 оценивали по отношению уровня протеолитически-активированной формы (19 кДа) к неактивной форме (35 кДа). Изменения статистически достоверны относительно группы без ЛНП (* $p < 0,05$) и нативных ЛНП (# $p < 0,05$)

при культивировании HUVECs с МДА-модифицированными ЛНП (рис. 1, *a*). Одновременно наибольшие изменения уровня экспрессии *NOX1* также были обнаружены при действии МДА-модифицированных ЛНП (увеличение в 40 раз), причем ГЛ-модифицированные ЛНП и МГЛ-модифицированные ЛНП обладали значительно меньшим эффектом (увеличение в 3 и 3,5 раза соответственно) (рис. 1, *a*).

Поскольку гиперактивация *LOX-1* и *NOX1* приводит к апоптозу эндотелиальных клеток [40] и их преждевременному старению [41], мы изучили влияние различных дикарбонил-модифицированных ЛНП на экспрессию основных проапоптотических маркеров в культивируемых эндотелиальных клетках. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что дикарбонил-модифицированные ЛНП индуцируют рост экспрессии генов *BAX*,

CASP9 и *CASP3*, которые играют ведущую роль в запуске апоптоза (рис. 2).

Как известно, ген *BAX* кодирует bcl-2-подобный белок 4, участвующий в открытии митохондриальной поры и запуске цитохром *c*-опосредованного апоптоза [42], ген *CASP9* кодирует индуцируемую каспазу-9, «вышестоящую» протеазу в апоптотическом каскаде [42], а ген *CASP3* кодирует эффекторную каспазу-3, играющую ведущую роль в стимуляции апоптоза [42]. Как видно из рис. 2, *a*, изменение уровня экспрессии гена *BAX* при культивировании в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП было статистически недостоверным ($p > 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем в контроле (без ЛНП) (рис. 2, *a*). Различия между этими показателями для генов *CASP9* и *CASP3* были достоверными, но незначительными (уровни значений в присутствии нативных ЛНП

были выше контроля на 30% и 20% соответственно) (рис. 2, б и в). Достоверное увеличение уровня экспрессии генов *BAX*, *CASP9* и *CASP3* было выявлено при культивировании эндотелиальных клеток в присутствии ЛНП, модифицированных всеми исследованными дикарбонилами: МДА, ГЛ и МГЛ (рис. 2, а–в). Наибольшие изменения уровня экспрессии этих генов были обнаружены при действии МДА-модифицированных ЛНП (увеличение в 3–6 раз), тогда как ГЛ-модифицированные ЛНП и МГЛ-модифицированные ЛНП обладали несколько меньшим эффектом (увеличение в 1,5–3 раза и 2–4 раза соответственно) (рис. 2, а–в). Как видно из рис. 2, г, уровень белка каспазы-3 находится в хорошем соответствии с уровнем мРНК *CASP3*. Из приведенных данных следует, что МДА-модифицированные ЛНП, вызывая существенный рост экспрессии генов *LOX-1* и *NOX1*, оказывают наиболее драматическое воздействие на эндотелиальные клетки, стимулируя их апоптотическую гибель (рис. 2, а–в), вероятно, вследствие гиперпродукции АФК [5, 6].

Действительно, не является удивительным тот факт, что резкое увеличение уровня АФК играет ведущую роль в апоптозе эндотелиальных клеток с гиперэкспрессией генов *LOX-1* и *NOX1* [5, 6]. Как отмечалось ранее, экспрессия *NOX1* приводит к гиперпродукции АФК [24], стимулируя активацию антиоксидантного ответа клетки [43]. Мы обнаружили, что МДА-модифицированные ЛНП вызывают наибольшую индукцию экспрессии генов антиоксидантного ответа в клетках HUVECs (табл. 2). Наиболее существенный рост показан для секреторной Cu/Zn супероксиддисмутазы (*SOD3*), глутатионпероксидазы 1 и 8 (*GPX1*, *GPX8*) и пероксиредоксинов (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX4*). Следует отметить, что среди исследованных генов наибольшая индукция обнаружена именно для генов пероксиредоксинов, что соответствует ранее полученным нами данным [17, 18] и подтверждает важнейшую роль этого семейства ферментов в антиоксидантной защите эндотелия.

Можно полагать, что клетки HUVECs должны реагировать на присутствие дикарбонил-

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов в клетках HUVECs при их культивировании в присутствии нативных и различных дикарбонил-модифицированных ЛНП

Гены	Без ЛНП	Нативные ЛНП	МДА-ЛНП	ГЛ-ЛНП	МГЛ-ЛНП
<i>CAT</i>	1	1,32	0,66	2,14	1,62
<i>SOD1</i>	1	1,0	1,62	1,87	2,14
<i>SOD3</i>	1	0,93	5,29*	2,02	1,95
<i>GPX1</i>	1	1,2	3,52*	0,96	1,07
<i>GPX3</i>	1	1,32	2,14	1,07	1,15
<i>GPX4</i>	1	1,0	1,07	0,42	1,62
<i>GPX7</i>	1	0,76	1,41	1,0	0,98
<i>GPX8</i>	1	1,1	4,92*	0,76	0,87
<i>PRDX1</i>	1	0,71	2,3*	1,32	1,41
<i>PRDX2</i>	1	1,23	13**	8,57**	8,57**
<i>PRDX3</i>	1	0,9	4,29*	2,46*	2,64*
<i>PRDX4</i>	1	0,5	2,46*	1,62	2,64*
<i>PRDX5</i>	1	1,02	1,62	1,15	1,07
<i>PRDX6</i>	1	0,76	1,32	0,31	1,07

Примечание. МДА-ЛНП – липопропротеиды низкой плотности, модифицированные малоновым диальдегидом; ГЛ-ЛНП – глиоксаль-модифицированные ЛНП; МГЛ-ЛНП – метилглиоксаль-модифицированные ЛНП. Представлены средние значения ($n = 5$) в каждой группе. Изменения статистически достоверны (выделены полужирным шрифтом) относительно контрольной группы клеток (без добавления ЛНП): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Таблица 3. Изменение уровня экспрессии маркерных генов в клетках HUVECs при их культивировании в присутствии нативных и различных дикарбонил-модифицированными ЛНП

Гены	Без ЛНП	Нативные ЛНП	МДА-ЛНП	ГЛ-ЛНП	МГЛ-ЛНП
<i>NFKB1</i>	1	0,97	1,77	2,86*	1,61
<i>NFE2L2</i>	1	1,08	6,19**	2,81*	2,04
<i>FOS</i>	1	2,2	4,59**	1,15	1,23
<i>STAT3</i>	1	1,87	4,2*	2,0	2,0
<i>TP53</i>	1	0,71	3,52*	2,87*	3,28*
<i>JNK</i>	1	2,2	4,29**	2,14	1,15
<i>TLR2</i>	1	2,1	1,57	2,3	1,8
<i>TLR4</i>	1	1,32	0,76	0,31*	0,38

Примечание. МДА-ЛНП – липопропротеиды низкой плотности, модифицированные малоновым диальдегидом; ГЛ-ЛНП – глиоксаль-модифицированные ЛНП; МГЛ-ЛНП – метилглиоксаль-модифицированные ЛНП. Представлены средние значения ($n = 5$) в каждой группе. Изменения статистически достоверны (выделены полужирным шрифтом) относительно контрольной группы клеток (без добавления ЛНП): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

модифицированных ЛНП дозозависимым образом, причем с ростом концентрации дикарбонил-модифицированных ЛНП возрастает окислительная нагрузка на клетку. Превышение антиоксидантного барьера, обеспеченного в первую очередь пероксиредоксинами (табл. 2), может индуцировать апоптотическую гибель HUVECs. Установлено, что редокс-гомеостаз клеток определяется балансом между прооксидантной и антиоксидантной системами, функция которых, в свою очередь, контролируется транскрипционным аппаратом клетки [44]. Мы сделали попытку оценить, какие регуляторные процессы могут превалировать в клетках HUVECs, культивируемых в присутствии дикарбонил-модифицированных ЛНП, проанализировав экспрессию некоторых маркерных генов (табл. 3), связанных с регуляцией антиоксидантного ответа (*NFE2L2*), воспаления (*NFKB1*, *TLR2*, *TLR4*, *JNK*) и апоптоза (*FOS*, *STAT3*, *JNK*, *TP53*).

Из табл. 3 видно, что наибольшие изменения в экспрессии маркерных генов наблюдаются в HUVECs, культивируемых в присутствии МДА-модифицированных ЛНП. Среди транскрипционных факторов наибольшее увеличение отмечено для NRF2 (*NFE2L2*), который при накоплении уровня внутриклеточных АФК является основным регулятором экспрессии генов, связанных с антиоксидантной защитой, обеспечивая тем самым поддержание клеточного редокс-гомеостаза [45]. Важно отметить, что увеличение уровня мРНК гена *NFE2L2* находится в соответствии с ро-

стом экспрессии генов антиоксидантного ответа (табл. 2). Обнаружено также повышение экспрессии гена *FOS*, который кодирует с-Fos, входящий вместе с белками Jun в комплекс транскрипционного фактора AP-1, регулирующего апоптоз, дифференцировку и пролиферацию клеток [46]. В свою очередь, транскрипционная активность AP-1 регулируется различными стимулами, из которых важная роль принадлежит АФК, и реализуется через окисление и последующее глутатионилирование цистеиновых остатков в субъединицах с-Fos и с-Jun [47]. Повышение экспрессии гена *FOS* сопровождается активацией каспаз в клетках HUVECs, культивируемых в присутствии дикарбонил-модифицированных ЛНП (рис. 2, б и в). Об активации проапоптотических тенденций под влиянием МДА-модифицированных ЛНП свидетельствует также увеличенная экспрессия гена *TP53*, кодирующего транскрипционный фактор p53 – важнейший активатор гибели клеток [48]. Вероятно, наибольший стресс среди исследованных групп клетки HUVECs испытывают под действием МДА-модифицированных ЛНП, о чем косвенно свидетельствует достоверное увеличение экспрессии гена (*STAT3*) транскрипционного фактора STAT3, который участвует в регуляции апоптоза и ответа клетки на цитокины, а также гена киназы JNK, которая активируется в стрессовых условиях [49]. Почти трехкратное увеличение экспрессии гена *NFKB1* (p50) в клетках HUVECs при обработке ГЛ-модифицированными ЛНП, по всей вероятности,

обусловлено активацией рецептора TLR2 (рост экспрессии *TLR2* более чем в 2 раза) при одновременном подавлении экспрессии гена *TLR4*. Это особенно важно отметить, поскольку TLR2-опосредованные сигналы оказывают влияние на экспрессию LOX-1 [50, 51], что еще раз указывает на сложную регуляцию ответа эндотелиальной клетки на окислительную модификацию ЛНП.

Ранее было показано, что увеличение экспрессии LOX-1 в клетках HUVECs под действием «окисленных» ЛНП вызывает активацию генов NADPH-оксидаз (*NOX1* и *NOX2*), что должно приводить к активному генерированию внутриклеточных АФК (преимущественно O_2^- и H_2O_2) [52]. В связи с этим чрезвычайно важно отметить, что нами была обнаружена мощная экспрессия гена *NOX1* в клетках HUVECs, культивируемых в присутствии не LOOH-содержащих, а МДА-модифицированных ЛНП (рис. 1, в). Кроме того, имеются данные о том, что трехкратное увеличение уровня МДА в плазме крови (до 15 мкМ) вдвое увеличивает синтез белков LOX-1 и NOX1 в клетках эндотелия аорты мышей [53]. Таким образом, МДА-модифицированные ЛНП, вероятно, могут являться важными индукторами экспрессии NOX1 в клетках эндотелия. В связи с этим следует отметить, что МДА-модифицированные ЛНП тем не менее весьма быстро элиминируются из кровотока млекопитающих, включая приматов [32, 33]. Эти данные не исключают предположение о важной роли МДА-модифицированных ЛНП в индукции генов *LOX-1* и *NOX1* в эндотелиальных клетках, учитывая крайне высокие патофизиологические потенциалы этой модификации ЛНП (рис. 1, а и б).

В последние годы проводятся многочисленные исследования о роли LOX-1 в развитии супероксид-зависимого повреждения стенки сосудов в связи с тем, что «окисленные» ЛНП являются индукторами экспрессии LOX-1 в эндотелиоцитах [5, 6, 20–23]. ЛНП в этих исследованиях окисляли при многочасовой инициации ионами Cu^{2+} (до 6 ч) или спонтанно (до 24 ч) [5, 6, 24, 54–56], т.е. провоцируя накопление и МДА-модифицированных ЛНП [27]. Действительно, процесс свободнорадикального окисления ЛНП протекает многостадийно, причем сначала образуются первичные молекулярные продукты окисления – липогидропероксиды, а затем вторичные продукты – низкомолекулярные дикарбонилы, важнейшим из которых является МДА. Как показано нами, в условиях длительного Cu^{2+} -зависимого свободнорадикального окис-

ления неизбежно получают не так называемые «окисленные ЛНП», а смесь истинно окисленных (LOOH-содержащих) ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП в произвольных пропорциях [27]. Несмотря на это, в подавляющем большинстве исследований роли LOX-1 в дисфункции эндотелия используют именно такие «окисленные» ЛНП, полученные при длительном Cu^{2+} -инициированном свободнорадикальном или спонтанном окислении [5, 6, 24, 54–56], что не позволяет корректно интерпретировать полученные результаты. В связи с этим крайне важным является установление различий в патофизиологическом действии LOOH-содержащих ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП. Согласно полученным нами ранее данным [6, 26, 27], не «окисленные» ЛНП (LOOH-содержащие ЛНП, полученные при ферментативном окислении С-15 липоксигеназой ретикулоцитов), а исключительно МДА-модифицированные ЛНП играют ведущую роль в образовании «пенистых» клеток и развитии липоидозных предатерогенных повреждений стенки сосудов. Результаты настоящего исследования подтверждают тот факт, что дикарбонил-модифицированные ЛНП (и, прежде всего, МДА-модифицированные ЛНП) играют важную роль в развитии дисфункции эндотелия, причем выводы предшествующих работ, в которых постулирована ведущая роль так называемых «окисленных» ЛНП, могут быть подвергнуты сомнению [5, 6]. Предлагаемый нами подход, основанный на изучении действия ЛНП, модифицированных различными природными низкомолекулярными дикарбонилами, кардинально отличается от ранее выполненных работ с использованием «окисленных» ЛНП. Очевидно, что отсутствие строго контролируемого состава «окисленных» ЛНП не позволяет установить конкретные действующие факторы в этих исследованиях. Развиваемые нами подходы позволяют исследовать патофизиологическое действие ЛНП, модифицированных конкретными дикарбонилами, накапливающимися при окислительном стрессе в процессе атерогенеза или карбонильном стрессе при развитии сахарного диабета.

Следует отметить, что опубликованные ранее данные с использованием так называемых «окисленных» ЛНП, полученных при Cu^{2+} -инициированном или спонтанном окислении, несомненно могут быть объяснены значительным накоплением МДА-модифицированных ЛНП в этих условиях [27], учитывая, что другие дикарбонил-модифицированные ЛНП ввиду отсутствия глюкозы образоваться не могут. Следовательно, как мы отмечали выше,

корректная трактовка результатов по эффектам «окисленных» ЛНП должна базироваться на признании неизбежного образования МДА-модифицированных ЛНП в этих системах, что позволяет учитывать данные многочисленных работ такого рода как дополнительное свидетельство важной роли дикарбонил-модифицированных ЛНП в дисфункции эндотелия. Таким образом, полученные в настоящей работе данные подтверждают высказанную нами ранее гипотезу о том, что дикарбонил-модифицированные ЛНП, провоцируя экспрессию *LOX-1* и *NOX1*, могут являться важным, если не ключевым, фактором молекулярных механизмов атерогенеза и диабетогенеза [5, 6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование роли дикарбонил-модифицированных ЛНП в *LOX-1*- и *NOX1*-опосредованных молекулярных механизмах дисфункции эндотелия ставит под сомнение ранее полученные результаты с использованием так называемых «окисленных» ЛНП, полученных при длительном Cu^{2+} -инициированном свободнорадикальном или спонтанном окислении частиц ЛНП. Поскольку при проведении окисления ЛНП в подобных условиях неизбежно образуется смесь истинно окисленных (ЛООН-содержащих) ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП в непредсказуемых пропорциях, приписывание ключевой роли в *LOX-1*-индуцируемых молекулярных механизмах дисфункции эндотелия так называемым «окисленным» ЛНП представляется не корректным. Фактически, нами обнаружено, что важная роль в индукции атерогенеза и диабетогенеза может принадлежать не ЛНП с обогащенными ЛООН фосфолипидами в наружном слое частиц, а ЛНП, в которых апопротеин В-100 подвергся химической модификации природными низкомолекулярными

дикарбонилами, что, естественно, приводит к изменению рецепторных свойств этого белка. Осознание этих результатов должно способствовать кардинальному изменению стратегии дальнейших исследований в связи с открывающимися возможностями изучения действия конкретных дикарбонил-накапливающихся в крови пациентов с атеросклерозом (таких как МДА) и сахарным диабетом (таких как глиоксаль и метилглиоксаль). Очевидно, что полученные данные диктуют кардинальное изменение стратегии фармакотерапии атеросклероза и диабета, поскольку она, по нашему мнению, должна быть направлена не на не оправдавшую себя антиоксидантную терапию [4, 5], а на создание препаратов из класса гидразинов, способных детоксицировать и утилизировать потенциально опасные молекулы дикарбонил-накапливающихся [57, 58].

Вклад авторов. Ланкин В.З. – общее руководство работой, написание статьи, обсуждение результатов; Шарапов М.Г. – проведение молекулярно-биологических исследований, написание статьи, обсуждение результатов, анализ литературы; Тихазе А.К. – участие в написании и редактировании статьи; Гончаров Р.Г. – проведение молекулярно-биологических исследований; Антонова О.А. – получение первичной культуры и культивирование HUVECs; Коновалова Г.Г. – выделение ЛНП и получение дикарбонил-модифицированных ЛНП; Новоселов В.И. – участие в написании и обсуждении статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00013).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров Р. Г., Шарапов М. Г. (2023) Ишемически-реперфузионные поражения: молекулярные механизмы патогенеза и способы их коррекции, *Мол. Биол.*, **6**, 1150-1174, doi: 10.31857/S0026898423060071.
2. Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., and Pinet, F. (2020) Oxidative stress in cardiovascular diseases, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 864, doi: 10.3390/antiox9090864.
3. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2003) Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease, *Free Radicals NO and Inflammation*, IOS Press, Amsterdam etc., **344**, 218-231.
4. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.

5. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 1565, doi: 10.3390/antiox11081565.
6. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2023) Malondialdehyde as an important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 128, doi: 10.3390/ijms24010128.
7. Spitteller, G. (2008) Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the Maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1126**, 128-133, doi: 10.1196/annals.1433.031.
8. Lankin, V. Z., Shadyro, O. I., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Sladkova, A. A. (2019) Non-enzymatic methylglyoxal formation from glucose metabolites and generation of superoxide anion radical during methylglyoxal-dependent cross-links reaction, *J. Antioxidant Activity*, **1**, 34-45, doi: 10.14302/issn.2471-2140.jaa-19-2997.
9. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Belova-Kumskova, E. M., Grechnikova, M. A., and Viigimaa, M. (2016) Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients, *J. Diabetes*, **8**, 398-404, doi: 10.1111/1753-0407.12309.
10. Lankin, V. Z., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Kurganov, B. I. (2017) Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **475**, 287-290, doi: 10.1134/S1607672917040123.
11. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide reducing enzymes in the regulation of free radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, doi: 10.1134/S0006297921100084.
12. Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis, *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785-1792, doi: 10.1172/JCI115499.
13. Yla-Herttuala, S. (1994) Role of lipid and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis, *Drugs Today*, **30**, 507-514.
14. Steinberg, D. (1995) Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 39-48, doi: 10.1007/978-1-4615-1957-7_5.
15. Lankin, V., Viigimaa, M., Tikhaze, A., Kumskova, E., Konovalova, G., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Kotkina, T., Yanushevskaya, E., and Vlasik, T. (2011) Cholesterol-rich low-density lipoproteins are also more oxidized, *Mol. Cell. Biochem.*, **355**, 187-191, doi: 10.1007/s11010-011-0853-y.
16. Viigimaa, M., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Tikhaze, A., Konovalova, G., Kumskova, E., and Lankin, V. (2010) Malondialdehyde modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis, *Blood Press*, **19**, 164-168, doi: 10.3109/08037051.2010.484158.
17. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Gordeeva, A. E., Novoselov, V. I., Antonova, O. A., Tikhaze, A. K., and Lankin, V. Z. (2016) Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **471**, 410-412, doi: 10.1134/S1607672916060090.
18. Lankin, V. Z., Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Tikhaze, A. K., and Novoselov, V. I. (2019) Natural dicarbonyls inhibit peroxidase activity of peroxiredoxins, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **485**, 132-134, doi: 10.1134/S1607672919020157.
19. Rubio-Gayosso, I., Platts, S. H., and Duling, B. R. (2006) Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H2247-H2256, doi: 10.1152/ajpheart.00796.2005.
20. Pirillo, A., Norata, G. D., and Catapano, A. L. (2013) LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis, *Mediat. Inflamm.*, **2013**, 152786, doi: 10.1155/2013/152786.
21. Lubrano, V., and Balzan, S. (2014) LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage, *Free Radic. Res.*, **48**, 841-848, doi: 10.3109/10715762.2014.929122.
22. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., and Bobryshev, Yu. V. (2016) LOX-1-mediated effects on vascular cells in atherosclerosis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **38**, 1851-1859, doi: 10.1159/000443123.
23. Kattoor, A. J., Kanuri, S. H., and Mehta, J. L. (2019) Role of Ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 1693-1700, doi: 10.2174/0929867325666180508100950.
24. Galle, J., Schneider, R., Heinloth, A., Wanner, C., Galle, P. R., Conzelmann, E., Dimmeler, S., and Heermeier, K. (1999) Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress, *Kidney Int.*, **55**, 1450-1461, doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00351.
25. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., Panasenko, O. M., Konovalova, G. G., and Belenkov, Y. N. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low-density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/S0006297907100069.
26. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kumskova, E. M. (2012) Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein, *Mol. Cell. Biochem.*, **365**, 93-98, doi: 10.1007/s11010-012-1247-5.
27. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Konovalova, G. G. (2023) Oxidized lipoproteins: definition of the term and pathophysiologic effects, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1910-1919, doi: 10.1134/S0006297923110196.
28. Antonov, A. S., Nikolaeva, M. A., Klueva, T. S., Romanov, Y. A., Babaev, V. R., Bystrevskaya, V. B., Perov, N. A., Repin, V. S., and Smirnov, V. N. (1986) Primary culture of endothelial cells from atherosclerotic human aorta. Part 1. Identification,

- morphological and ultrastructural characteristics of two endothelial cell subpopulations, *Atherosclerosis*, **59**, 1-19, doi: 10.1016/0021-9150(86)90027-4.
29. Tertov, V. V., Kaplun, V. V., Dvoryantsev, S. N., and Orekhov, A. N. (1995) Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low-density lipoprotein oxidation *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 608-613, doi: 10.1006/bbrc.1995.2329.
30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
31. Requena, J. R., Fu, M. X., Ahmed, M. U., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Baynes, J. W., and Thorpe, S. R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein, *Biochem. J.*, **322**, 317-325, doi: 10.1042/bj3220317.
32. Tikhaze, A. K., Domogatsky, S. P., and Lankin, V. Z. (2021) Clearance of carbonyl-modified low-density lipoproteins in rabbits, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, **15**, 119-124, doi: 10.1134/S1990750821020104.
33. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Domogatsky, S. P., Tikhaze, A. K., Klots, I. N., and Ezhov, M. V. (2023) Clearance and utilization of dicarbonyl-modified LDL in monkeys and humans, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10471, doi: 10.3390/ijms241310471.
34. Schalkwijk, C. G., Vermeer, M. A., Stehouwer, C. D., te Koppele, J., Princen, H. M., and van Hinsbergh, V. W. (1998) Effect of methylglyoxal on the physicochemical and biological properties of low-density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**, 187-198, doi: 10.1016/s0005-2760(98)00112-x.
35. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., and Novoselova, E. G. (2021) The role of TLR4/NF- κ B signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
36. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
37. 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, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
38. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Parfenyuk, S. B., and Glushkova, O. V. (2022) Effect of peroxiredoxin 6 on p53 transcription factor level, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 839-849, doi: 10.1134/S0006297922080156.
39. Aoyama, T., Fujiwara, H., Masaki, T., and Sawamura, T. (1999) Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **31**, 2101-2114, doi: 10.1006/jmcc.1999.1041.
40. Hong, D., Bai, Y. P., Gao, H. C., Wang, X., Li, L. F., Zhang, G. G., and Hu, C. P. (2014) Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway, *Atherosclerosis*, **235**, 310-317, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.028.
41. Wang, Y. C., Lee, A. S., Lu, L. S., Ke, L. Y., Chen, W. Y., Dong, J. W., Lu, J., Chen, Z., Chu, C. S., Chan, H. C., Kuzan, T. Y., Tsai, M. H., Hsu, W. L., Dixon, R. A. F., Sawamura, T., Chang, K. C., and Chen, C. H. (2018) Human electronegative LDL induces mitochondrial dysfunction and premature senescence of vascular cells *in vivo*, *Aging cell*, **17**, e12792, doi: 10.1111/acer.12792.
42. Bagci, E. Z., Vodovotz, Y., Billiar, T. R., Ermentrout, G. B., and Bahar, I. (2006) Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores, *Biophys. J.*, **90**, 1546-1559, doi: 10.1529/biophysj.105.068122.
43. Batty, M., Bennett, M. R., and Yu, E. (2022) The role of oxidative stress in atherosclerosis, *Cells*, **11**, 3843, doi: 10.3390/cells11233843.
44. Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dyballa-Rukes, N., McNamara, C. A., and Altschmied, J. (2017) Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology, *Antioxid. Redox Signal*, **26**, 679-699, doi: 10.1089/ars.2016.6946.
45. Leonarduzzi, G., Sottero, B., and Poli, G. (2010) Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited, *Pharmacol. Ther.*, **128**, 336-374, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.003.
46. Szalóki, N., Krieger, J. W., Komáromi, I., Tóth, K., and Vámosi, G. (2015) Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 3785-3798, doi: 10.1128/MCB.00346-15.
47. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3633-3638, doi: 10.1073/pnas.94.8.3633.
48. Shi, T., and Dansen, T. B. (2020) Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxid. Redox Signal.*, **33**, 839-859, doi: 10.1089/ars.2020.8074.
49. Ji, Z., He, L., Regev, A., and Struhl, K. (2019) Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9453-9462, doi: 10.1073/pnas.1821068116.
50. Kielian, T., Haney, A., Mayes, P. M., Garg, S., and Esen, N. (2005) Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-

- induced brain abscess, *Infect. Immun.*, **73**, 7428-7435, doi: 10.1128/IAI.73.11.7428-7435.
51. Ohgi, K., Kajiya, H., Goto-T, K., Okamoto, F., Yoshinaga, Y., Okabe, K., and Sakagami, R. (2018) Toll-like receptor 2 activation primes and upregulates osteoclastogenesis via lox-1, *Lipids Health Dis.*, **17**, 132, doi: 10.1186/s12944-018-0787-4.
 52. Lee, W.-J., Ou, H.-C., Hsu, W.-C., Chou, M.-M., Tseng, J.-J., Hsu, S.-L., Tsai, K.-L., and Sheu, W. H.-S. (2010) Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells, *J. Vasc. Surg.*, **52**, 1290-1300, doi: 10.1016/j.jvs.2010.04.085.
 53. Chan, S. H., Hung, C. H., Shih, J. Y., Chu, P. M., Cheng, Y. H., Lin, H. C., Hsieh, P. L., and Tsai, K. L. (2018) Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling, *Redox Biol.*, **14**, 116-125, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.016.
 54. Zhao, R., Ma, X., Xie, X., and Shen, G. X. (2009) Involvement of NADPH oxidase in oxidized LDL-induced upregulation of heat shock factor-1 and plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, E104-E111, doi: 10.1152/ajpendo.91023.2008.
 55. Furman, C., Martin-Nizard, F., Fruchart, J. C., Duriez, P., and Teissier, E. (1999) Differential toxicities of air (mO-LDL) or copper-oxidized LDLs (Cu-LDL) toward endothelial cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **13**, 316-323, doi: 10.1002/(sici)1099-0461(1999)13:6<316::aid-jbt5>3.0.co;2-o.
 56. Sangle, G. V., Zhao, R., and Shen, G. X. (2008) Transmembrane signaling pathway mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1243-E1254, doi: 10.1152/ajpendo.90415.2008.
 57. Galvani, S., Coatrieux, C., Elbaz, M., Grazide, M. H., Thiers, J. C., Parini, A., Uchida, K., Kamar, N., Rostaing, L., Baltas, M., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2008) Carbonyl scavenger and anti-atherogenic effects of hydrazine derivatives, *Free. Radic. Biol. Med.*, **45**, 1457-1467, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.026.
 58. Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., and Baltas, M. (2010) Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 3019-3026, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.03.031.

DICARBONYL-MODIFIED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS ARE KEY INDUCERS OF *LOX-1* AND *NOX1* GENE EXPRESSION IN CULTURED HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIOCYTES

V. Z. Lankin¹, M. G. Sharapov^{2*}, A. K. Tihaze¹, R. G. Goncharov², O. A. Antonova¹,
G. G. Konovalova¹, and V. I. Novoselov²

¹ National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E. I. Chazov,
Ministry of Health of Russia, 121552 Moscow, Russia

² Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: sharapov.mg@yandex.ru

The expression of *LOX-1* and *NOX1* genes in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) when cultured in the presence of low-density lipoproteins (LDL) modified with various natural dicarbonyls was investigated for the first time. It was found that of the investigated dicarbonyl-modified LDLs (malondialdehyde (MDA)-modified LDLs, glyoxal-modified LDLs, and methylglyoxal-modified LDLs), namely MDA-modified LDLs caused the greatest induction of *LOX-1* and *NOX1* genes, as well as genes of antioxidant enzymes and genes of signaling molecules in HUVECs. MDA-modified LDLs also induce the highest peroxiredoxins expression of the studied antioxidant enzyme genes. The key role of dicarbonyl-modified LDLs in the molecular mechanisms of vascular wall damage and endothelial dysfunction is discussed.

Keywords: low-density lipoproteins (LDL), dicarbonyl-modified LDL, expression of *LOX-1* and *NOX1* genes, molecular mechanisms of atherogenesis and diabetogenesis

НОЦИСТАТИН И ПРОДУКТЫ ЕГО ПРОТЕОЛИЗА КАК ДВОЙНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ КИСЛОТО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ 3-ГО ТИПА (ASIC3), ОБЛАДАЮЩИЕ БОЛЕВЫМ И ОБЕЗБОЛИВАЮЩИМ ЭФФЕКТОМ

© 2023 Д.И. Осмаков^{1,2*}, Н.В. Тарасова², А.А. Недорубов³, В.А. Паликов⁴,
Ю.А. Паликова⁴, И.А. Дьяченко⁴, Я.А. Андреев^{1,2}, С.А. Козлов^{1*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: osmadim@gmail.com; serg@ibch.ru

² Институт молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России,
119991 Москва, Россия

³ Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, 119991 Москва, Россия

⁴ Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290 Пушино, Россия

Поступила в редакцию 15.09.2023

После доработки 27.10.2023

Принята к публикации 30.10.2023

Нейропептид ноцистатин (NS) экспрессируется клетками нервной системы и нейтрофилами как часть белка-предшественника и может подвергаться ограниченному протеолизу путём поэтапной деградации. Ранее было показано, что NS крысы (rNS) способен активировать чувствительные к кислоте ионные каналы (ASIC), но этот эффект частично коррелирует с кислотной природой NS. В этой работе мы исследовали изменение свойств rNS в процессе его деградации как нейропептида путём сравнения rNS и двух его синтезированных фрагментов. Мы оценили их активность на каналах ASIC3 крысы, экспрессированных в ооцитах лягушки, и их эффект в болевых тестах на мышах. Мы показали, что rNS сочетает в себе свойства как положительных, так и отрицательных модуляторов ASIC3, что выражается в способности снижать стационарную десенситизацию канала в диапазоне pH 6,8–7,0 и уменьшении реакции канала на кислотные стимулы в диапазоне pH 6,0–6,9. Укороченный аналог (rNSΔ21, 21 аминокислотный остаток с N-конца) сохранил эффект только положительного модулятора ASIC3, в то время как пентапептид с C-конца (rNSΔ30) сохранил способность проявлять себя только как отрицательный модулятор ASIC3. Эта тенденция была подтверждена в тестах на животных, где rNS и rNSΔ21 индуцировали поведение, связанное с болью, а rNSΔ30 проявлял обезболивающий эффект. Таким образом, мы показали изменение направленности действия rNS при поэтапной деградации от молекулы, усиливающей боль, к обезболивающему средству, поэтому конечный пентапептид можно даже рассматривать как многообещающую отправную точку для дальнейшей разработки лекарственного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейропептид, ноцистатин, ASIC-каналы, электрофизиология, боль, анальгезия.

DOI: 10.31857/S032097252312014X, **EDN:** NQUQTQ

ВВЕДЕНИЕ

Перспективными объектами для разработки инновационных препаратов являются ионные каналы, непосредственно участвующие в процессе ноцицепции. Среди этих ионных каналов особый интерес представляют кисло-

то-чувствительные ионные каналы (ASIC), которые селективны по отношению к катионам Na⁺ и экспрессируются в нейронах периферической и центральной нервной системы (ПНС и ЦНС). ASIC-каналы участвуют в обнаружении локальных изменений pH внеклеточной среды для активации болевого сигнала в ПНС,

Принятые сокращения: ПНС – периферическая нервная система; ASIC – кислото-чувствительные ионные каналы; NS – ноцистатин; rNS – крысиный ноцистатин; SD – стандартное отклонение; SSD – стационарная десенситизация.

* Адресат для корреспонденции.

а в ЦНС – в регуляции передачи сигнала между нейронами [1, 2]. Четыре гена млекопитающих кодируют шесть изоформ ASIC: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4 [3]. Изоформа ASIC1a преобладает в нейронах ЦНС, тогда как в нейронах ПНС преобладают изоформы ASIC1a и ASIC3 [4–6]. ASIC реагируют на кислотный стимул быстро активируемым и десенситизированным током, который при воздействии pH 7,3 или меньше может подвергаться стационарной десенситизации (SSD – состояние, в котором канал теряет чувствительность к сильному стимулу после воздействия слабого неактивирующего стимула). Изоформа ASIC3 дополнительно обладает способностью поддерживать неде-сенситизируемый ток (устойчивый компонент тока), продолжающийся до тех пор, пока применяется стимул [7, 8]. Присутствуя в нейронах ПНС, каналы ASIC3 являются важными участниками патофизиологических процессов, связанных с хронической и ишемической болью [9–11]. Высокая плотность ASIC на постсинаптических мембранах рассматривается как свидетельство их участия в тонкой настройке процесса синаптической передачи, поскольку высвобождение нейротрансмиттеров сопровождается локальным подкислением, достаточным для активации ASIC [12].

Помимо протонов, известно несколько лигандов, активирующих ASIC-каналы. К экзогенным лигандам относятся токсин MitTx из яда змеи *Micrurus tener tener*, активирующий ASIC1- и ASIC3-содержащие каналы [13], а также природный бисбензилизохинолиновый алкалоид линдолдхамин из растения *Laurus nobilis* и синтетический 2-гуанидин-4-метилхиназолин (GMQ), активирующий каналы ASIC3 [14–16]. Эндогенные лиганды включают лизофосфатидилхолин [17], агматин [14], изохинолиновые алкалоиды тетрагидропапаверолин (ТГП) и ретикулин [18] и, наконец, нейропептид ноцистатин (NS). Показано, что крысиный ноцистатин (rNS) способен активировать все изоформы ASIC, а предварительная инкубация канала с пептидом приводит к ингибированию ответа на протонный стимул (эффект, аналогичный SSD) [19].

Некоторые эндогенные нейропептиды имеют ограниченное время жизни и ступенчатую деградацию [20], поэтому целью данного исследования был мониторинг активности пептида rNS длиной в 35 аминокислот во время его ступенчатой деградации. Здесь мы описываем модулирующее действие rNS и продуктов его деградации на каналы ASIC3, а также действие этих пептидов в болевых тестах на мышцах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. NS и его фрагменты были синтезированы по индивидуальному заказу компанией «Shanghai Royobiotech Co., Ltd» (Китай; чистота > 95%). GMQ был получен от «Sigma-Aldrich» (Штайнхайм, Германия). Пептид Ugr9-1 был получен путём гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli* [21]. Рабочие растворы пептидов для электрофизиологических экспериментов готовили в буфере ND96, значение pH этих растворов контролировали непосредственно перед экспериментами.

Этическое заявление. Экспериментальные процедуры в данном исследовании соответствовали Международным руководящим принципам для биомедицинских исследований с участием животных, изданным Всемирной организацией здравоохранения, а также рекомендациям ARRIVE (Исследования на животных: отчёты об экспериментах *in vivo*) и «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 18.03.1986). Институциональная комиссия по уходу и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол № 351/2022 от 24 ноября 2022 г.) и Институциональная комиссия по контролю и использованию лабораторных животных филиала Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол № 891/22 от 17 мая 2022 г.) одобрили проведение экспериментов. Исследование проводилось на базе ветеринарной Лаборатории биологических исследований ФИБХ РАН в Пущино, Россия. Процедуры ухода за животными проводились в соответствии со стандартными операционными процедурами Лаборатории.

Выделение ооцитов *Xenopus laevis* и инъекция мРНК. Самок лягушек *X. laevis*, содержащихся при 20 ± 2 °C, анестезировали 0,17%-ным трикаин метансульфонатом (MS222), после чего небольшую часть яичника удаляли через разрез брюшной полости и помещали в среду ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ и 5 mM HEPES, титрованный до pH 7,4 с помощью NaOH). У прооперированных животных признаков послеоперационного дистресс-синдрома не наблюдалось. Для каждого животного интервал между операциями составлял не менее трёх месяцев. Соединительную ткань и элементы фолликулярной оболочки удаляли обработкой коллагеназой (1 мг/мл в среде ND96 без кальция)

в течение 2 ч при комнатной температуре. Отсортированные здоровые дефолликулированные ооциты IV и V стадий развития хранили в среде ND96 и вводили в них 8–10 нг мРНК через 16–18 ч после выделения. мРНК, синтезированную из плазмид PCi, содержащих изоформу крысиного ASIC3, вводили в ооциты с помощью системы микроинъекции Nanolitre 2000 («World Precision Instruments», Сарасота, США). После инъекции ооциты хранили 2–3 дня при 18 °С, а затем – до 7 дней при 15 °С в среде ND96 с добавлением гентамицина (50 мкг/мл).

Электрофизиологические записи. Токи ASIC3 для цельных клеток регистрировались с использованием метода двухэлектродной фиксации потенциала с помощью усилителя GeneClamp 500 («Axon Instruments», США) при удерживающем потенциале –50 мВ. Микроэлектроды заполняли 3 М раствором KCl. Внешний раствор представлял собой ND96 (рН 7,4, 7,3 и 7,2) и ND96, в котором 5 мМ HEPES был заменён на 5 мМ MOPS (рН 7,0, 6,9, 6,6). Активирующим раствором служил буфер ND96, в котором 5 мМ HEPES заменяли на 10 мМ MOPS с доведением рН до 7,0, 6,9, 6,8, 6,7 и 6,6 или на 10 мМ MES с доведением рН до 6,5, 6,0 и 5,5. Скорость потока и быстрая смена растворов в регистрационной камере контролировались собственной компьютерной клапанной системой. Данные фильтровались на частоте 10 Гц и оцифровывались на частоте 100 Гц с помощью АЦП L780 («LCard», Россия).

Анализ *in vivo*. Половозрелые мыши-самцы линии C57BL/6 в возрасте 8–10 недель (массой 21–23 г) с SPF-статусом были получены из племенного комплекса Института биоорганической химии РАН. Животных содержали в помещении барьерного типа с автоматической сменой дневного и ночного периодов (08:00–20:00 – «дневной», 20:00–08:00 – «ночной») и не менее чем 12-кратной сменой воздуха в помещении за час. В каждом помещении осуществлялся постоянный автоматический контроль температуры и влажности с помощью компьютеризированной системы «Эквис Visual Lab» (ООО «Практика-НЦ», Москва, Россия). Мышей акклиматизировали в течение 2 недель перед экспериментальными процедурами, помещая в стандартные клетки из поликарбоната типа 3 (1820 см²) с подстилкой SAFE BK8/15 («JRS», Германия), свободным доступом к полноценному питанию (Velaz FORTI 1324 Maintenance Diet, «Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG», Германия) и фильтрованной водопроводной воде. Клетки для

мышей содержали домики Mouse House™ («Tecniplast», Бугуджате, Италия).

В каждой опытной и контрольной группе содержалось по 7–9 животных для оценки интенсивности острой боли и по 5–7 животных для теста «уксуснокислых корчей» (общее количество животных составило 111). Никаких статистических методов или явного анализа мощности для предварительного определения размера выборки перед экспериментами не проводилось, поскольку не было предварительных данных для оценки эффективности пептидов на мышах. Полученные результаты были значительными, поэтому дополнительные животные не умерщвлялись. При планировании и проведении экспериментов на животных применялся слепой метод формирования групп и проведения всех последующих процедур.

В исследовании не использовались фармацевтические методы облегчения боли и страдания животных, поскольку эксперименты были направлены на контролируемое моделирование болевых синдромов и оценку анальгетической эффективности химических соединений. Однако количество животных, использованных в исследовании, было минимально возможным для получения надёжных результатов.

Оценка интенсивности острой боли. Фосфатно-солевой буфер (PBS; рН 7,4) отдельно или соединения, растворённые в буфере PBS (рН 7,4), а также кислый раствор (буфер PBS, рН 5,5) вводили внутривенно в постоянном объёме 20 мкл. Ноцифентивное поведение определяли как время облизывания лапы в течение 30 мин после инъекции. Пептид Ugr9-1 вводили внутривенно за 30 мин до тестирования.

Тест «уксуснокислые корчи». Мышей разделяли на отдельные группы и за 30 мин до тестирования внутривенно вводили пептиды или физиологический раствор. Внутривенно вводили 0,6%-ный раствор уксусной кислоты в физиологическом растворе (10 мл/кг) и сразу после этого мышей помещали в прозрачные стеклянные цилиндры, где регистрировали количество корчей, возникших в течение 15 мин.

Статистический анализ данных. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8.6 («OriginLab Corporation», Нортгемптон, США).

Зависимости амплитуды тока через каналы ASIC3 крысы от рН-ответа аппроксимировались уравнением Хилла $F1(x) = ((A1 - A2) / (1 + (x/[H^+]_{50})^{nH})) + A2$; где $[H^+]_{50}$ – концентрация протонов, при которой достигается полумаксимальная амплитуда тока; $A1$ – минимальное значение тока; $A2$ – амплитуда

максимального ответа; n_H — коэффициент Хилла. Максимальную амплитуду (I_{max}) рассчитывали на основе значений амплитуд, полученных при каждом рН для каждого ооцита отдельно путём индивидуальной подгонки. Затем данные нормализовали до рассчитанного значения I_{max} . Нормализованные данные были усреднены и подогнаны по логистическому уравнению $F1(x)$.

Перед дисперсионным анализом был проведён тест Шапиро–Уилка для определения нормального распределения данных. Непарный критерий Стьюдента, состоящий из двух средних значений ($M1$ и $M2$) и общей стандартной ошибки (SE) двух выборок ($t = (M1 - M2)/SE$), использовался для определения значимости разницы между средними значениями, полученными в экспериментах *in vitro* (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>). Значимость различий в данных, полученных в результате испытаний на животных, определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки.

Уровень значимости: *, \$, & $p < 0,05$; **, \$\$, && $p < 0,01$; ***, \$\$\$, &&& $p < 0,005$; ****, \$\$\$\$, &&&& $p < 0,001$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн пептидов. Как и другие нейропептиды, rNS, по-видимому, подвергается деградации вследствие важного регуляторного процесса в живом организме (см. отличный обзор Hallberg [22]). В частности, нейропептид ноцицептин/орфанин FQ, синтезируемый как общий предшественник с rNS [23], метаболизируется в различных частях организма мыши, крысы и человека с помощью множества ферментов: аминопептидазы N, эндопептидазы 24.15 и нейтральной эндопептидазы 24.11 [24–26]. Расщепление пролилэндопептидазой по Pro21 могло привести к образованию фрагмента rNS Δ 21 (таблица) [27, 28]. Кроме

того, в качестве конечной точки можно ожидать самый короткий пептид (rNS Δ 30) по аналогии с энкефалином, который также состоит из 5 остатков и катаболизируется той же эндопептидазой 24.11 [29].

Действие NS и продуктов его деградации на каналы ASIC3. Активность как rNS, так и продуктов его протеолиза измеряли методом двух-электродной фиксации потенциала на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих каналы ASIC3 крысы (rASIC3). Для выяснения механизма действия rNS мы исследовали влияние пептида на протонную чувствительность канала. Для этого мы выбрали концентрацию rNS 200 мкМ и протестировали, как изменится зависимость SSD и активации rASIC3. Таким образом, rNS значимо смещал рН, необходимый для полумаксимальной стационарной десенситизации (pH_{50} SSD), в сторону более высокой концентрации протонов (более низкого рН) (с $pH 7,13 \pm 0,03$ до $pH 7,005 \pm 0,085$; $n = 10-20$; $p < 0,05$, t -критерий) (рис. 1, а, в), а также существенно смещал рН, необходимый для полумаксимальной активации (pH_{50} акт), в сторону более низкого значения (с $pH 6,46 \pm 0,16$ до $pH 6,26 \pm 0,03$; $n = 13-27$, $p < 0,05$, t -критерий, рис. 1, б, в). Следует отметить, что значение n_H для рН-зависимости SSD уменьшилось в два раза по сравнению с контролем (с $8,2 \pm 1,2$ до $3,97 \pm 2,43$), тогда как значение n_H для рН-зависимости активации каналов достоверно не изменилось (с $2,3 \pm 1,3$ до $2,6 \pm 0,3$).

Для двух других пептидов, rNS Δ 21 и rNS Δ 30, такие же измерения проводили при той же концентрации 200 мкМ. rNS Δ 21 значительно смещал pH_{50} SSD в сторону более низких значений (с $7,13 \pm 0,03$ ($n_H = 8,2 \pm 1,2$) до $7,07 \pm 0,03$ ($n_H = 6,97 \pm 2,43$); $n = 10-20$; $p < 0,05$, t -тест) (рис. 1, з, д), но не смещал значения pH_{50} акт (с $6,46 \pm 0,16$ до $6,44 \pm 0,03$) и n_H (с $2,3 \pm 1,3$ до $2,3 \pm 0,3$, $n = 15-27$) (рис. 1, д). rNS Δ 30 незначительно смещал pH_{50} SSD в сторону более низких концентраций протонов (более высоких значений) (от $7,13 \pm 0,03$ ($n_H = 8,2 \pm 1,2$) до $7,14 \pm 0,03$

Обозначение пептидов и аминокислотная последовательность

Обозначение пептида	Последовательность
rNS	MPRVRSVVQARDAEPEADAEPVADEADEVEQKQLQ
rNS Δ 21 ¹	-----VADEADEVEQKQLQ
rNS Δ 30	-----QKQLQ

¹ Дn обозначает количество укороченных аминокислот.

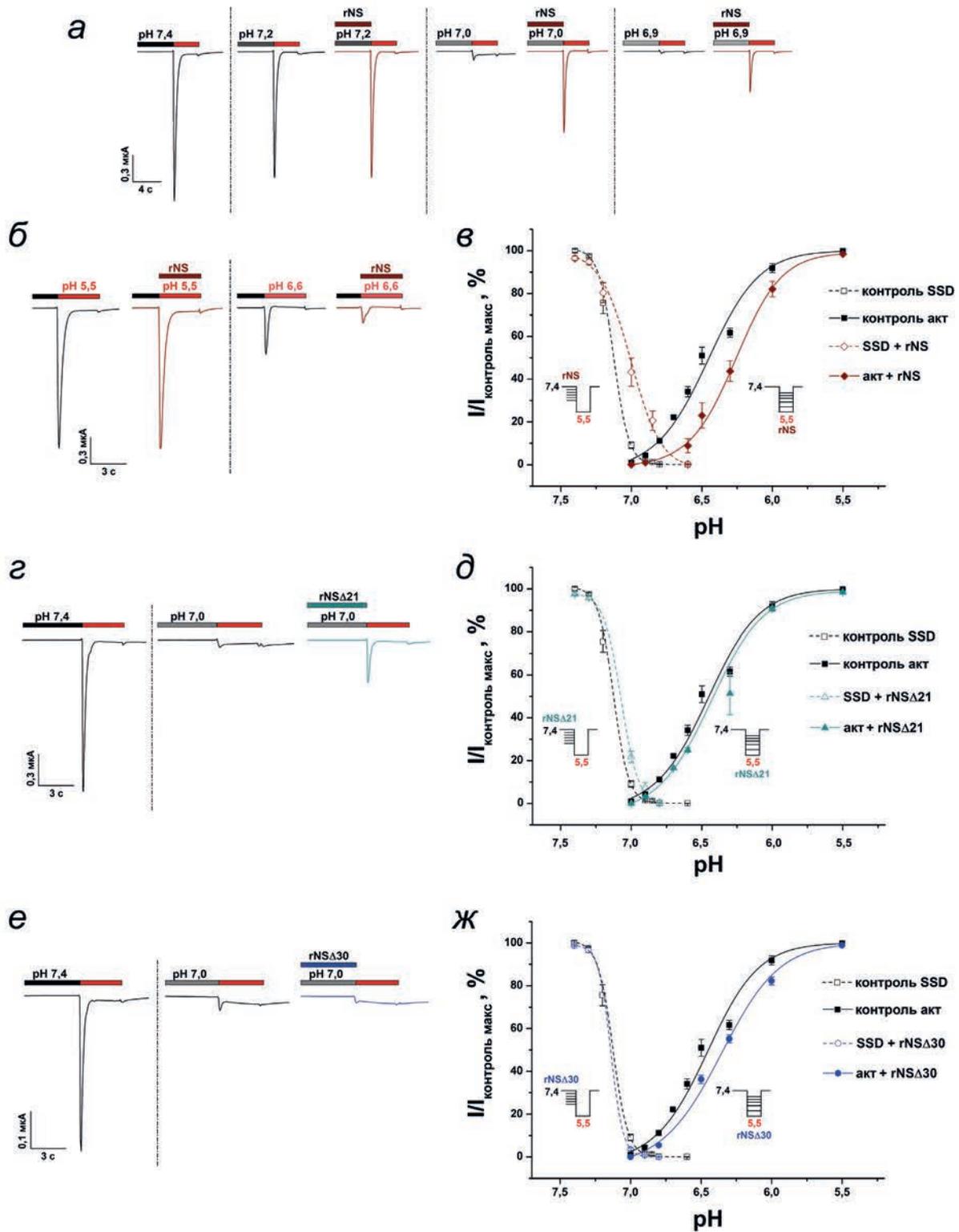


Рис. 1. Влияние rNS и его укороченных аналогов на pH-зависимость активации и стационарной десенситизации ASIC3-канала. *а* – Репрезентативные профили тока, полученные из одного и того же ооцита при активации стимулом с pH 5,5 после предварительной инкубации при различных кондиционирующих pH либо без, либо в присутствии 200 мкМ rNS. *б* – Репрезентативные профили тока, полученные при активации различными стимулами pH либо без, либо в присутствии 200 мкМ rNS (кондиционирующий pH 7,4). *в* – Зависимости стационарной десенситизации (штриховая линия) и активации (сплошная линия) от pH для гASIC3 как без, так и в присутствии 200 мкМ rNS (n = 10–27). *г, е* – Репрезентативные профили тока, полученные из одного и того же ооцита при активации стимулом с pH 5,5 после предварительной инкубации с кондиционирующим pH 7,0 либо без, либо в присутствии 200 мкМ rNSΔ21 (*г*), 200 мкМ rNSΔ30 (*е*). *д* и *ж* – pH-зависимости стационарной десенситизации (штриховая линия) и активации (сплошная линия) для гASIC3 как без, так и в присутствии 200 мкМ rNSΔ21 (*д*), 200 мкМ rNSΔ30 (*ж*) (n = 10–27)

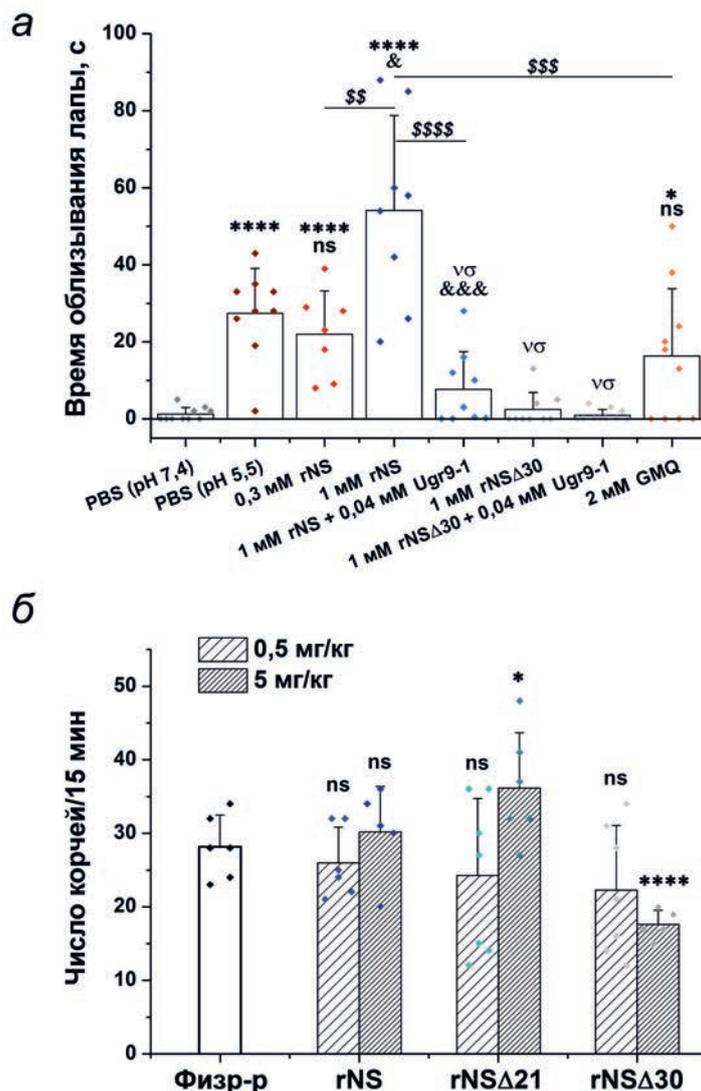


Рис. 2. Поведение, связанное с болью, и анальгетические эффекты, вызванные rNS и продуктами его деградации. *а* – Поведение, связанное с болью, измеренное по времени, затраченному на облизывание лапы после инъекции PBS, пептидов или GMQ (20 мкл). Данные представлены как средние значения \pm SD ($n = 7-10$). * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$, vσ, незначительно по сравнению с группой PBS (pH 7,4); & $p < 0,05$, &&& $p < 0,005$, ns, незначительно по сравнению с группой PBS (pH 5,5); \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,005$, \$\$\$\$ $p < 0,001$ по сравнению с группой 1 mM rNS. *б* – Влияние rNS, rNSΔ21 и rNSΔ30 на корчи, вызванные уксусной кислотой. Внутривенное введение пептидов мышам (за 30 мин до тестирования) усиливало (как в случае с rNSΔ21) или, наоборот, ослабляло (как в случае rNSΔ30) ответ на внутрибрюшинное введение уксусной кислоты, что оценивалось по количеству корчей в интервале 15 мин. Данные представляют собой средние значения \pm SD ($n = 5-7$). * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$, ns, незначительно по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор

($n_H = 9,98 \pm 2,5$); $n = 10-20$) (рис. 1, *е*, *ж*) и значимо смещал рН₅₀ акт в сторону более низких значений (от $6,46 \pm 0,16$ ($n_H = 2,3 \pm 1,3$) до $6,36 \pm 0,12$ ($n_H = 2,1 \pm 0,9$); $n = 16-27$; $p < 0,05$, *t*-критерий) (рис. 1, *ж*).

Эффект NS и продуктов его протеолиза *in vivo*. Каналы ASIC3 играют важную роль в различных болевых процессах [11, 30, 31], а лиганды, способные активировать эти каналы, вызывают болевой ответ. Действительно, инъекция rNS в заднюю лапу мышей вызывала острое болевое поведение, измеряемое как общее

время лизания животным инъекционной лапы (рис. 2, *а*). Этот эффект был дозозависимым, и rNS (1 mM) был в два раза эффективнее, чем введение контрольного буфера с pH 5,5.

Совместное введение rNS и Ugr9-1 (пептида, селективно ингибирующего активность каналов ASIC3 и обладающего анальгезирующими свойствами) приводило к практически полному подавлению болевого ответа (рис. 2, *а*). Таким образом, болевое поведение, связанное с инъекцией rNS, скорее всего, было опосредовано каналами ASIC3.

В другом болевом тесте оценивали влияние гNS и его фрагментов на интенсивность висцеральной боли, вызванной внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты, которое измеряли по количеству произвольных сокращений живота за 15 мин. гNS не оказывал существенного влияния на поведение, связанное с болью, тогда как гNSΔ21 и гNSΔ30 значимо увеличивали и уменьшали интенсивность болевой реакции соответственно (рис. 2, б). гNSΔ21 увеличивал количество корчей на 28% по отношению к контрольной группе и на 20% по отношению к группе, получавшей гNS. гNSΔ30, напротив, оказывал анальгетический эффект в этом тесте, уменьшая количество корчей на 37,5% относительно группы физраствора и на 42% относительно группы гNS, что хорошо согласовывалось с его чистым ингибирующим действием на канал ASIC3 *in vitro* (рис. 1, ж).

ОБСУЖДЕНИЕ

Крысиный NS представляет собой нейропептид длиной 35 аминокислот, который вырабатывается в клетках вместе с ноцицептином (NC) из одного белка-предшественника. NC подвергается весьма разнообразному процессу ферментативной деградации, что должно указывать на тот же путь деградации, что и в случае гNS. Здесь мы протестировали только 3 фрагмента, представляющие гNS, усечённые с N-конца разным количеством аминокислот. Данные *in vitro* показали, что гNS одновременно проявляет способность как положительно, так и отрицательно модулировать ASIC3. Выступая в роли положительного модулятора, гNS достоверно (на 0,12 ед.) смещал значение pH_{50} SSD в более кислую область (рис. 1, в), а это означает, что для десенситизации каналу необходима существенно более высокая концентрация протонов. Наиболее отчётливо этот эффект можно наблюдать при кондиционирующем pH 7,0: в контроле амплитуда ответа канала на кислотный стимул (pH 5,5) составила $9,1 \pm 5,7\%$ от максимального ответа при физиологическом кондиционировании pH 7,4–7,3, тогда как при предварительной инкубации с гNS при pH 7,0 амплитуда увеличивалась до $43,3 \pm 14,7\%$ от максимума (рис. 1, а; рис. 3).

Отрицательная модуляция гNS была показана на pH-зависимости активации ASIC3, где гNS также достоверно (на 0,25 ед.) смещал значение pH_{50} акт в более кислую область (рис. 1, в). На сегодняшний день гNS является первым эндогенным нейропептидом позво-

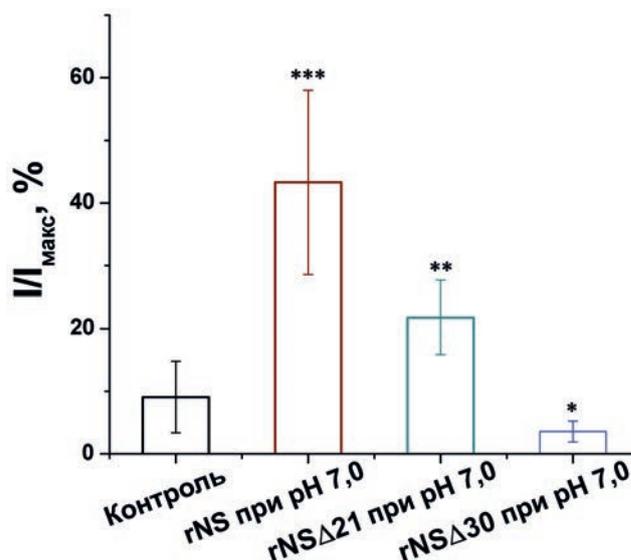


Рис. 3. гNS и гNSΔ21, но не гNSΔ30, препятствуют стационарной десенситизации канала. Усреднённые данные токов ($I/I_{\text{макс}}$) получали при использовании pH 5,5 на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих гASIC3, после предварительной инкубации при pH 7,0 с 200 мкМ указанного пептида или без него; значения приводили в % от токов, полученных при использовании pH 5,5 после предварительной инкубации при pH 7,4. Звёздочки указывают на значительную разницу с контролем (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). Данные представлены как среднее \pm SD; $n = 5-15$

ночных, оказывающим такое влияние на изоформы ASIC3 [32]. Другой эндогенный нейропептид – динорфин – оказывает аналогичный эффект в концентрациях, сравнимых с таковыми для гNS, но его действие ограничено изоформой ASIC1a [33, 34].

Интересно, что гNSΔ21 проявлял только положительные модуляторные свойства на ASIC3, что выражалось в значимом сдвиге (на 0,05 ед.) значения pH_{50} SSD в более кислую область (рис. 1, д), и, как следствие, амплитуда ответа канала на кислотный стимул при pH 7,0 составляла $21,8 \pm 5,9\%$ от максимального значения (рис. 1, г; рис. 3). Таким образом, положительная модулирующая активность гNSΔ21 была в 2 раза ниже, чем у полноразмерного гNS. Самый короткий пептид, гNSΔ30, проявлял лишь отрицательные модуляторные свойства, существенно (на 0,15 ед.) смещая значение pH_{50} акт в более кислую область (рис. 1, ж) и незначительно усиливая десенситизирующий эффект при кондиционирующем pH 7,0, что приводило к снижению ответа до $3,6 \pm 1,7\%$ от максимума (рис. 1, е; рис. 3).

Для пептида гNS впервые продемонстрирована способность индуцировать болевое поведение в тесте острой боли на мышах (рис. 2, а). Как показали Kuspiel et al. [35] (это также коррелирует с нашими данными),

гNS в концентрации 0,3 мМ способен подкислять среду до pH 6,6–6,7. Однако известно, что введение раствора с таким значением pH не вызывает выраженного острого болевого эффекта. В то же время 0,3 мМ гNS оказывал болевой эффект, сравнимый по силе с действием буфера с pH 5,5, что подтверждало влияние активности гNS на болевое поведение. Более того, эффект от применения 0,3 мМ гNS был сравним по силе с эффектом от 2 мМ GMQ, который, как было показано, индуцирует связанное с болью поведение посредством активации ASIC3 [14]. Дополнительным доказательством вклада ASIC3 в генерацию боли в этой модели стало снижение уровня боли в группе, получавшей гNS вместе с пептидом Ugr9-1, который является антагонистом ASIC3.

Интересно, что в тесте абдоминальных корчей, индуцированных уксусной кислотой, при системном введении вещества для гNS не наблюдалось ни проноцицептивного, ни анальгетического эффекта, тогда как укороченные аналоги гNSΔ21 и гNSΔ30 демонстрировали проноцицептивный и анальгезирующий эффекты соответственно (рис. 2, б). Этот результат можно объяснить двунаправленной активностью гNS на ASIC3 в качестве как положительного, так и отрицательного модулятора, тогда как гNSΔ21 и гNSΔ30 проявляли свойства только положительного и отрицательного модуляторов соответственно.

Таким образом, продукты деградации гNS представляют собой наглядный пример взаимосвязи структура-активность, и мы можем видеть, как фармакологические свойства регуляторной молекулы постепенно транс-

формируются после протеолиза от вызывающих/усиливающих боль к анальгетическим. Более того, гNSΔ30 можно рассматривать как молекулу-кандидата для разработки анальгезирующего препарата. Дальнейшие работы по оптимизации этого пептида должны продемонстрировать перспективы его развития в качестве инновационного препарата.

Вклад авторов. С.А.К., Д.И.А., Я.А.А. – инициировали и руководили исследованием; Д.И.О., Н.В.Т., А.А.Н., В.А.П., Я.А.П. – проводили эксперименты; Д.И.О., И.А.Д., Я.А.А., С.А.К. – обсудили результаты экспериментов с участием всех авторов; Д.И.О., С.А.К. – написали текст; А.А.Н., Я.А.А. – редактировали текст статьи.

Благодарности. Мы благодарны Сильви Диошо (Институт фармакологии молекулярной и клеточной медицины, Вальбонн, Франция) за плазмиду PCi, содержащую кДНК крысиного ASIC3.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-75-10021 (<https://rscf.ru/project/22-75-10021/>).

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 утверждённым правовым актам РФ и международных организаций. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chu, X.-P., and Xiong, Z.-G. (2012) Physiological and pathological functions of acid-sensing ion channels in the central nervous system, *Curr. Drug Targets*, **13**, 263-271, doi: 10.2174/138945012799201685.
2. Carattino, M. D., and Montalbetti, N. (2020) Acid-sensing ion channels in sensory signalling, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **318**, F531-F543, doi: 10.1152/ajprenal.00546.2019.
3. Wemmie, J. A., Price, M. P., and Welsh, M. J. (2006) Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities, *Trends Neurosci.*, **29**, 578-586, doi: 10.1016/j.tins.2006.06.014.
4. Deval, E., and Lingueglia, E. (2015) Acid-sensing ion channels and nociception in the peripheral and central nervous systems, *Neuropharmacology*, **94**, 49-57, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.02.009.
5. Schuhmacher, L.-N., and Smith, E. S. J. (2016) Expression of acid-sensing ion channels and selection of reference genes in mouse and naked mole rat, *Mol. Brain*, **9**, 97, doi: 10.1186/s13041-016-0279-2.
6. Boscardin, E., Alijevic, O., Hummler, E., Frateschi, S., and Kellenberger, S. (2016) The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁺ channel (ENaC): IUPHAR review 19, *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 2671-2701, doi: 10.1111/bph.13533.
7. Osmakov, D. I., Khasanov, T. A., Andreev, Y. A., Lyukmanova, E. N., and Kozlov, S. A. (2020) Animal, herb, and microbial toxins for structural and pharmacological study of acid-sensing ion channels, *Front. Pharmacol.*, **11**, 991, doi: 10.3389/fphar.2020.00991.

8. Salinas, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2009) Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3, *J. Biol. Chem.*, **284**, 31851-31859, doi: 10.1074/jbc.M109.043984.
9. Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., et al. (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain, *EMBO J.*, **27**, 3047-3055, doi: 10.1038/emboj.2008.213.
10. Yagi, J., Wenk, H. N., Naves, L. A., and McCleskey, E. W. (2006) Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia, *Circ. Res.*, **99**, 501-519, doi: 10.1161/01.RES.0000238388.79295.4c.
11. Dulai, J. S., Smith, E. S. J., and Rahman, T. (2021) Acid-sensing ion channel 3: an analgesic target, *Channels*, **15**, 94-127, doi: 10.1080/19336950.2020.1852831.
12. Gründer, S., and Pusch, M. (2015) Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs), *Neuropharmacology*, **94**, 9-18, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.016.
13. Bohlen, C. J., Chesler, A. T., Sharif-Naeni, R., Medzihradsky, K. F., Zhou, S., et al. (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain, *Nature*, **479**, 410-414, doi: 10.1038/nature10607.
14. Yu, Y., Chen, Z., Li, W.-G., Cao, H., Feng, E.-G., et al. (2010) A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel, *Neuron*, **68**, 61-72, doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.001.
15. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Andreev, Y. A., Dubinnyi, M. A., Kublitski, V. S., et al. (2018) Proton-independent activation of acid-sensing ion channel 3 by an alkaloid, lindoldhamine, from *Laurus nobilis*, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 924-937, doi: 10.1111/bph.14134.
16. Alijevic, O., and Kellenberger, S. (2012) Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline, *J. Biol. Chem.*, **287**, 36059-36070, doi: 10.1074/jbc.M112.360487.
17. Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., et al. (2016) Non-acidic activation of pain-related acid-sensing ion channel 3 by lipids, *EMBO J.*, **35**, 414-428, doi: 10.15252/embj.201592335.
18. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Andreev, Y. A., and Kozlov, S. A. (2017) Endogenous isoquinoline alkaloids agonists of acid-sensing ion channel type 3, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 282, doi: 10.3389/FNMOL.2017.00282.
19. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Ivanov, I. A., Andreev, Y. A., and Kozlov, S. A. (2019) Endogenous neuropeptide nocistatin is a direct agonist of acid-sensing ion channels (ASIC1, ASIC2 and ASIC3), *Biomolecules*, **9**, 401, doi: 10.3390/BIOM9090401.
20. Hallberg, M., and Nyberg, F. (2003) Neuropeptide conversion to bioactive fragments – an important pathway in neuromodulation, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **4**, 31-44, doi: 10.2174/1389203033380313.
21. Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Andreev, Y. A., Dyachenko, I. A., Bondarenko, D. A., et al. (2016) Conversed mutagenesis of an inactive peptide to ASIC3 inhibitor for active sites determination, *Toxicon*, **116**, 11-16, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.11.019.
22. Hallberg, M. (2015) Neuropeptides: metabolism to bioactive fragments and the pharmacology of their receptors, *Med. Res. Rev.*, **35**, 464-519, doi: 10.1002/med.21323.
23. Okuda-Ashitaka, E., and Ito, S. (2014) Nocistatin: milestone of one decade of research, *Curr. Pharmaceut. Design*, **21**, 868-884, doi: 10.2174/1381612820666141027112451.
24. Sakurada, C., Sakurada, S., Orito, T., Tan-No, K., and Sakurada, T. (2002) Degradation of nociceptin (orphanin FQ) by mouse spinal cord synaptic membranes is triggered by endopeptidase-24.11: an *in vitro* and *in vivo* study, *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 1293-1303, doi: 10.1016/S0006-2952(02)01295-9.
25. Terenius, L., Sandin, J., and Sakurada, T. (2000) Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites, *Peptides*, **21**, 919-922, doi: 10.1016/S0196-9781(00)00228-X.
26. Montiel, J. L., Cornille, F., Roques, B. P., and Noble, F. (1997) Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15, *J. Neurochem.*, **68**, 354-361, doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68010354.x.
27. Mentlein, R., and Struckhoff, G. (1989) Purification of two dipeptidyl aminopeptidases II from rat brain and their action on proline-containing neuropeptides, *J. Neurochem.*, **52**, 1284-1293, doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb01877.x.
28. Kozlov, S. A., and Grishin, E. V. (2007) The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors, *Toxicon*, **49**, 721-726, doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.007.
29. Erdős, E. G., and Skidgel, R. A. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones, *FASEB J.*, **3**, 145-151, doi: 10.1096/fasebj.3.2.2521610.
30. Wu, J., Liu, T. T., Zhou, Y. M., Qiu, C. Y., Ren, P., et al. (2017) Sensitization of ASIC3 by proteinase-activated receptor 2 signaling contributes to acidosis-induced nociception, *J. Neuroinflammation*, **14**, 150, doi: 10.1186/s12974-017-0916-4.
31. Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., et al. (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain, *Pharmacol. Ther.*, **128**, 549-558, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.006.
32. Gründer, S., Ramírez, A. O., and Jékely, G. (2023) Neuropeptides and degenerin/epithelial Na⁺ channels: a relationship from mammals to cnidarians, *J. Physiol.*, **601**, 1583-1595, doi: 10.1113/JP282309.

33. Vick, J. S., and Askwith, C. C. (2015) ASICs and neuropeptides, *Neuropharmacology*, **94**, 36-41, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.012.
34. Borg, C. B., Braun, N., Heusser, S. A., Bay, Y., Weis, D., et al. (2020) Mechanism and site of action of big dynorphin on ASIC1a (supplementary), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 7447-7454, doi: 10.1073/pnas.1919323117.
35. Kuspiel, S., Wiemuth, D., and Gründer, S. (2021) The neuropeptide nocistatin is not a direct agonist of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a), *Biomolecules*, **11**, 571, doi: 10.3390/biom11040571.

NOCISTATIN AND PRODUCTS OF ITS PROTEOLYSIS AS DUAL MODULATORS OF TYPE 3 ACID-SENSING ION CHANNELS (ASIC3) WITH AN ALGESIC AND ANALGESIC EFFECT

**D. I. Osmakov^{1,2*}, N. V. Tarasova², A. A. Nedorubov³, V. A. Palikov⁴, Y. A. Palikova⁴,
I. A. Dyachenko⁴, Y. A. Andreev^{1,2}, and S. A. Kozlov^{1*}**

¹ *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: osmadim@gmail.com; serg@ibch.ru*

² *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia*

⁴ *Branch of the Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Russia*

The neuropeptide nocistatin (NS) is expressed by cells of the nervous system and neutrophils as part of a precursor protein and can undergo limited proteolysis through stepwise degradation. Previously, it was shown that rat NS (rNS) is able to activate acid-sensing ion channels (ASIC), but this effect correlated with the acidic nature of NS. In this work, we investigated the change in the properties of rNS during its degradation by a comparison of rNS and its two synthesized fragments. We estimated their activity on rat ASIC3 channels expressed in *X. laevis* oocytes, and the effects in pain tests on mice. We have shown that rNS combines the properties of both positive and negative modulators of ASIC3, which is expressed in the ability to lower the channel's steady-state desensitization in the pH range 6.8-7.0 and the reduction of the channel's response to stimuli in the 6.0-6.9 pH range. A shortened analogue (rNS Δ 21) (21 amino acid residues (aa) from the N-terminus) retained the effect of the ASIC3 positive modulator only, while the C-terminal pentapeptide (rNS Δ 30) retained the ability of the ASIC3 negative modulator only. This tendency was confirmed in animal tests, where rNS and rNS Δ 21 induced pain related behavior, but rNS Δ 30 showed an analgesic effect. Thus, we have shown the change of the rNS action mode during stepwise degradation, from an algesic molecule through a pain-enhancer to a pain-relief wherefore the final pentapeptide can even be considered as a promising starting point for further drug development.

Keywords: neuropeptide, nocistatin, ASIC channels, electrophysiology, pain, analgesia

ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ ВИРИОНА А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ ПРИ ОГРАНИЧЕННОМ ПРОТЕОЛИЗЕ *in situ* ПО ДАННЫМ ТРИТИЕВОГО МЕЧЕНИЯ И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2023 А.Л. Ксенофонов^{1*}, Л.А. Баратова¹, П.И. Семенюк¹,
Н.В. Федорова¹, Г.А. Бадун²

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

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

Поступила в редакцию 26.09.2023

После доработки 02.11.2023

Принята к публикации 14.11.2023

Белки оболочки (БО) вирионов потивируса А-вируса картофеля (АВК) содержат на поверхности частично неупорядоченные *N*-концевые домены, необходимые для выполнения жизненно важных функций вируса. В данной работе на основе данных, полученных методом тритиевой планиграфии, проведён сравнительный анализ структур БО в интактных вирионах АВК и в частицах вируса, лишённых *N*-концевых 32 аминокислот (АВКΔ32). С использованием структуры атомного разрешения БО потивируса *Y* картофеля (YVK), который является гомологом АВК, проведён расчёт доступной поверхности белков вириона YVK и определены области межсубъединичных/межвитковых контактов. Для этого использовали подход, основанный на обкатке сферической пробой поверхности белка, доступной растворителю (Lee, B., and Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 379–400). Сравнение профилей включения тритиевой метки в интактный и частично деградированный вирион АВКΔ32 выявило положение Δ*N*-пептида, экранирующего остатки 66–73, 141–146 и входящие в межвитковую область остатки 161–175. Было обнаружено наличие каналов/полостей в белковой оболочке вириона, благодаря которым он оказался частично проницаемым для атомов трития. При удалении Δ*N*-пептида наблюдалось уменьшение содержания метки внутри вириона (в области а.о. 184–200), что указывало на возможный структурный переход, приводящий к компактизации вириона и вследствие этого меньшей доступности для трития его внутренних регионов. На основании полученных данных можно сделать вывод, что часть поверхностного Δ*N*-пептида расположена между витками спирали вириона, это увеличивает шаг спирали и обеспечивает большую гибкость вириону, что важно для межклеточного транспорта вирусов в растениях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: потивирусы, белок оболочки, А-вирус картофеля, *N*-концевые неупорядоченные домены, структурное моделирование, тритиевая планиграфия.

DOI: 10.31857/S0320972523120151, **EDN:** NQXBNG

ВВЕДЕНИЕ

Потивирусы представляют собой важную группу вирусов растений, которые наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству. Поэтому их структурному и функциональному исследованию уделяется существенное внимание. Гибкие нитевидные вирионы потивирусов имеют спиральную симметрию со средней длиной частиц 700 нм и

диаметром 11–14 нм. С помощью ряда структурных и предсказательных методов анализа показано, что белки оболочки (БО) потивирусов частично разупорядочены, что также затрудняет их исследование [1, 2]. Существует широкий спектр методов определения структур вирусных частиц, включая физико-химические исследования и методы электронной микроскопии (ЭМ), особенно крио-ЭМ. Несмотря на сложность изучения гибких частиц,

Принятые сокращения: АВК – А-вирус картофеля; АВКΔ32 – вирионы А-вируса картофеля, лишённые 32 *N*-концевых аминокислот; БО – белок оболочки; ЭМ – электронная микроскопия; YVK – Y-вирус картофеля.

* Адресат для корреспонденции.

сочетание различных подходов, изучение свойств мутантных вирусов, а также достижения в области вычислительных методов и обработки изображений [1, 3–5] привели к лучшему пониманию структуры вирионов потивирусов и роли фрагментов их БО в вирусном цикле.

Первая модель структуры БО типичного представителя потивирусов, А-вируса картофеля (АВК), была предложена в 2001 г. [3]. Частицы вируса подвергали бомбардировке термически активированными атомами трития и определяли внутримолекулярное распределение метки в аминокислотах БО, чтобы оценить их стерическую доступность *in situ*. Модель пространственного расположения полипептидной цепи БО АВК внутри вирусной частицы была предложена на основе экспериментальных данных, полученных при бомбардировке тритием, в сочетании с предсказаниями элементов вторичной структуры и принципов упаковки спиралей и структур в белках. Модель предсказывает три домена третичной структуры: (i) открытый извне *N*-концевой домен, включающий неструктурированный *N*-конец из 8 аминокислот и два β -тяжа, (ii) *S*-концевой домен, включающий две спирали, а также три β -тяжа, которые образуют двухслойную структуру, называемую блоком abCd, и (iii) центральный домен, содержащий пучок из четырёх спиралей, подобный найденному в БО вируса табачной мозаики. В течение многих лет это была единственная модель, которую использовали для объяснения трёхмерной структуры БО потивирусов.

Важным поворотным моментом в развитии представлений о структуре потивирусов стало использование крио-ЭМ. С её помощью была определена трёхмерная структура вирионов нескольких потивирусов – вируса мозаики арбуза (ВМА) [6], *Y*-вируса картофеля (YVK) [4] и вируса мозаики турнепса (ВМТу) [7]. Эти структуры высокого разрешения подтвердили существование консервативной трёхдоменной архитектуры, общей для неродственных потивирусов и отличающейся от гипотетической модели АВК [3]. Полученные атомные структуры ВМА, YVK и ВМТу имели идентичное лево-спиральное расположение в вирионе субъединиц БО, которые состояли из центрального ядра с семью α -спиралями и одной или двумя β -шпильками, а также *N*- и *S*-концевых доменов, не имеющих выраженной вторичной структуры. Структуры гибких разупорядоченных *N*-концевых пептидов, подверженных воздействию растворителя, не были определены, предположительно из-за раз-

упорядоченности и подвижности, поэтому в атомных структурах ВМА, YVK и ВМТу отсутствуют первые 59, 43 или 65 аминокислотных остатков соответственно. Во всех трёх потивирусах расположенные на поверхности электроположительные *N*-концевые домены взаимодействовали с электроотрицательной канавкой соседних молекул БО, устанавливая боковые контакты, а также опосредуя продольную полимеризацию частиц аналогично потексвирусам [8, 9]. По-видимому, гибкость и неструктурированность *N*-концевых доменов в сочетании с их контактами с соседними субъединицами обеспечивает дополнительную гибкость вирионам [4, 6], необходимую, например, для облегчения межклеточного транспорта [10].

Важно отметить, что при выделении и хранении препаратов потивирусов часто наблюдается естественный *in situ* протеолиз трипсиноподобными протеазами клеточного сока, приводящий к удалению 30–50 *N*-концевых остатков (ΔN -пептидов) [11, 12]. При этом такие частицы остаются инфекционными. Биологическая значимость этого явления предположительно связана с необходимостью высвобождения инфекционных частиц из стелетов тли для последующей передачи растению [13, 14].

Основной задачей данного исследования было определение точной локализации ΔN -пептидов на поверхности вириона АВК и выяснение влияния их удаления на возможное изменение структуры вирионов. Вследствие гибкости и частичной разупорядоченности БО АВК эффективным и информативным оказался метод тритиевой планиграфии [15]. Данный подход основан на неселективном замещении водорода в углеводородных фрагментах молекул на его радиоактивный изотоп – тритий. Тритий используется как нанозонд с эффективным радиусом 0,09 нм для определения аминокислотных остатков, локализованных на поверхности вириона, а также в полостях, доступных для атомов трития [16–18]. В основе метода лежат химические реакции с участием горячих атомов трития; подобраны условия, при которых реакция, приводящая к включению метки, происходит при однократном столкновении и характеризует стерическую доступность связи *C*-*H* в составе вириона. Получаемые с помощью этого метода данные о стерической доступности компонентов системы характеризуют структуру всего объекта. Метод тритиевой планиграфии [15] успешно использовали для получения информации о пространственной организации белков,

их комплексов и таких сложноорганизованных биологических объектов, как рибосома [19], вирусы растений и животных [3, 20–22]. Бомбардировка исследуемого объекта потоком атомов трития с последующим анализом внутримолекулярного распределения метки позволяет определить доступные фрагменты – остатки аминокислот, составляющие его «поверхность», тесно связанную с пространственной структурой. В настоящей работе на основе анализа данных бомбардировки поверхности тритием мы детально охарактеризовали структуру трипсинизированных вирионов А-вируса картофеля без 32 *N*-концевых а.о. (АВКΔ32) и определили точную локализацию ΔN-пептидов на поверхности вириона АВК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов интактных и частично деградированных вирионов АВК. Изолят В11 вириона АВК очищен, как описано ранее [3]. Для получения деградированных вирионов (АВКΔ32) препарат интактного вируса обрабатывали трипсином в соотношении фермент/субстрат 1 : 500 (по массе), 15 мин инкубировали при комнатной температуре, для остановки реакции добавляли фенолметилсульфонил фторид до концентрации 1 мМ. Очистку препарата проводили осаждением вирионов при 105 000 *g* (100 мин, 5 °С). Концентрацию препарата АВК определяли, используя коэффициент поглощения $E_{260\text{ нм}}^{0,1\%} = 2,3$. Спектры поглощения в УФ-диапазоне 240–340 нм измеряли на спектрофотометре Hitachi UV-2600 («Hitachi», Япония) в кюветах с длиной оптического пути 0,1–1,0 см. Истинные спектры поглощения (*E*) светорассеивающих суспензий вычисляли по методу экстраполяции [23]. Во всех экспериментах использовались только препараты АВК с нормальным соотношением E_{260}/E_{280} (~1,25), что указывало на отсутствие дефектных вирусных частиц. Контроль чистоты образцов также осуществляли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия по методу Лэммли [24], используя 15%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) в электрофорезной камере Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США). Данные просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показывали отсутствие каких-либо дефектных вирионов в исходных и обработанных трипсином препаратах [5].

Введение трития. 1 мл суспензии вируса в 0,05 М боратном буфере (рН 8,0) с концентрацией 1–2 мг/мл распыляли из пульверизатора на стенки цилиндрического реакционного со-

уда, предварительно охлаждённого жидким азотом, вакуумировали и наполняли молекулярным тритием до давления 0,5 Па. При нагревании до 2000 К вольфрамовой спирали, расположенной вдоль центральной оси реакционного сосуда, молекулярный тритий диссоциировал на атомы, и образующиеся атомы трития бомбардировали суспензию вирионов, охлаждаемую жидким азотом. Спираль зажигали на 15 с, затем остаточный тритий откачивали и процедуру напуска трития – зажигания спирали повторяли ещё два раза. После введения метки препарат размораживали и вирусную суспензию концентрировали центрифугированием (105 000 *g*, 5 °С, 100 мин). Для удаления лабильной тритиевой метки препараты меченых вирусов подвергали 1–2 циклам осаждения вирионов при 105 000 *g*. Из очищенных вирусов выделяли белки стандартным литиевым методом [25]. Контроль чистоты препаратов осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ [24].

Ферментативный гидролиз белков. Полученные препараты белков подвергали триптическому гидролизу. К растворам белков добавляли раствор трипсина (TPСК-trypsin, «Sigma», США) в соотношении фермент/субстрат 1 : 50 (по массе) и проводили гидролиз при 37 °С в течение 4 ч, для остановки реакции добавляли фенолметилсульфонил фторид до концентрации 1 мМ.

Аналитические методы. Полученные в результате ферментативного гидролиза смеси пептидов разделяли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращённой фазе на колонке Ultrasphere ODS, 5 мкм, 250 × 4,6 мм («Beckman», США), с использованием хроматографической системы фирмы «Beckman» в градиентном режиме. Для разделения использовали два элюента (А и Б): элюент А представлял собой 0,1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, элюент Б состоял из 0,1%-ного раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Использовали линейный градиент до 60% элюента Б в течение 60 мин, а затем линейный градиент до 80% элюента Б в течение 10 мин при скорости потока 1 мл/мин. Детекцию проводили по поглощению при длинах волн 215 и 280 нм. Фракции, соответствующие индивидуальным пептидам, собирали для дальнейшего анализа. Пептиды подвергали кислотному гидролизу, как описано ранее [26].

Кислотные гидролизаты анализировали на аминокислотном анализаторе Amino Acid Analyzer L8800 («Hitachi») с катионообменной колонкой и нингидриновой дериватизацией

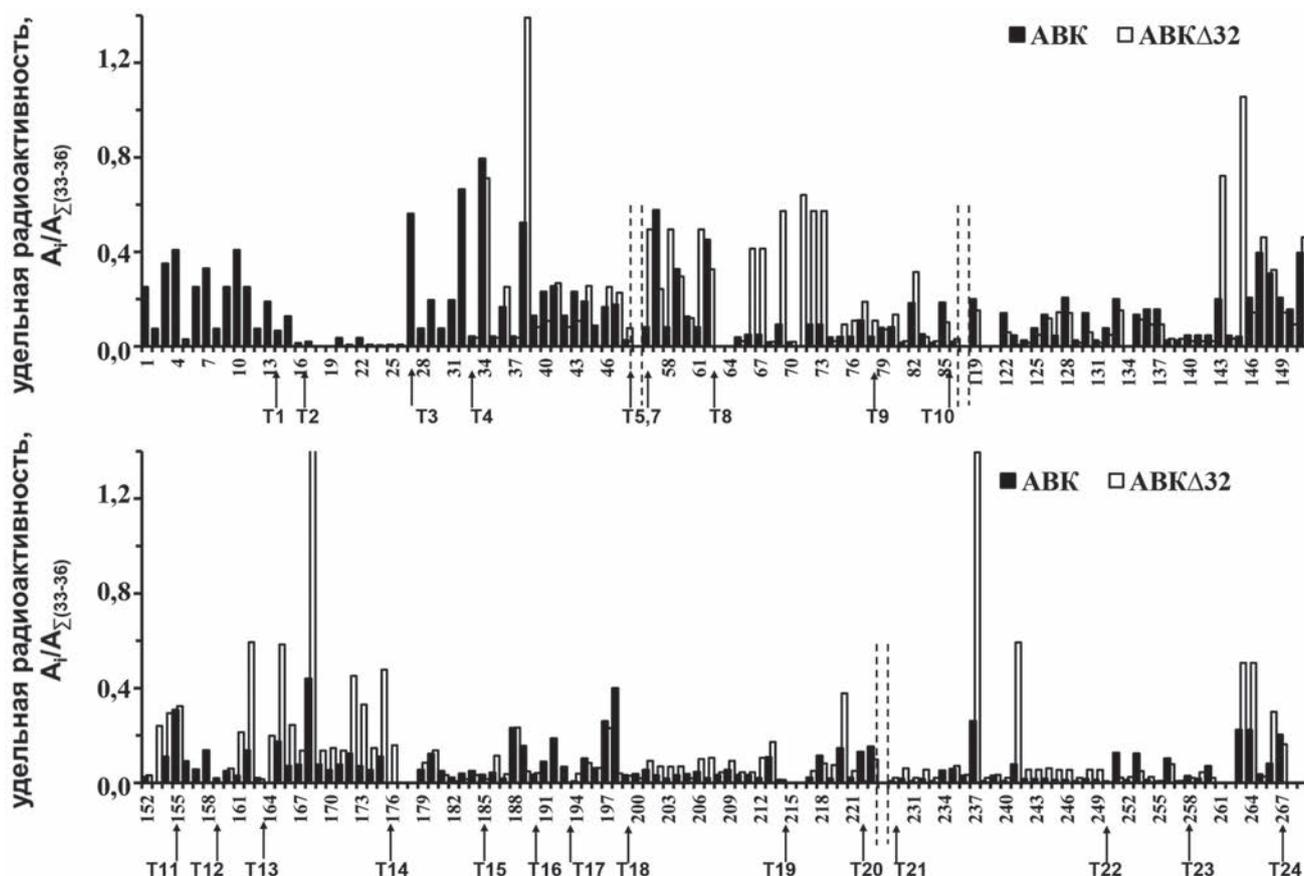


Рис. 1. Распределение тритиевой метки по аминокислотным остаткам белков вирионов АВК и АВКΔ32 с учётом реакционной способности атомов трития при реакции с разными аминокислотами. $A_i/A_{\Sigma(33-36)}$ — удельные радиоактивности остатка (A_i), нормированные на сумму удельных радиоактивностей поверхностных остатков 33–36. На оси абсцисс указана нумерация аминокислотных остатков. Сайты расщепления трипсином показаны стрелками. Данные для цистеина и триптофана не показаны, поскольку они разрушаются кислотным гидролизом. Пунктиром показано положение отсутствующих пептидов. График разделён на две последовательные части (верхнюю и нижнюю) для лучшей визуализации

с нашими модификациями [27]. Для одновременного измерения радиоактивности элюата использовали проточный счётчик Radiomatic 150TR Flow Scintillation Analyzer («Packard Co», США). Получаемые данные (оптическая плотность элюата при длинах волн 570 и 440 нм и его радиоактивность) обрабатывались с помощью программы «МультиХром для Windows» (ЗАО «Амперсэнд», Россия). Далее, рассчитывали молярную радиоактивность для каждого аминокислотного остатка в пептиде [28].

Расчёт доступной поверхности вириона проведён с использованием пакета GROMACS 5,1 [29]. Учитывали только часть доступной поверхности, занимаемую атомами водорода, присоединёнными к атомам углерода (СН-поверхность); часть поверхности, занимаемую другими атомами, игнорировали. Радиус зонда составлял 0,09 нм. Для определения областей межмолекулярных контактов аналогичным образом рассчитывали поверхность для индивидуальной субъединицы, затем

определяли долю поверхности, закрываемую при сборке вирусной частицы. Для визуализации белковых структур использовали программу RasMol (<http://www.rasmol.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование вирусных частиц АВК и АВКΔ32 методом тритиевой планиграфии. Ранее мы наблюдали, что при хранении интактных препаратов АВК происходит расщепление молекул БО *in situ* протеазами клеточного сока в положениях аминокислот 32 и 42 [11]. Ограниченный трипсинолиз препарата интактного вируса (в соотношении фермент/субстрат 1 : 500, 15 мин) также приводил к отщеплению 32 N-концевых остатков из БО вириона, что было подтверждено масс-спектроскопией и электрофорезом в ПААГ [11], и по данным ПЭМ вирионы сохраняли свою целостность [5]. В данной работе нами проведён сравнитель-

ный анализ структур двух видов препаратов: интактных вирионов АВК и частично деградированных трипсином вирионов АВКΔ32 (Материалы и методы). Распределение тритиевой метки вдоль полипептидной цепи после мечения тритием препаратов интактных АВК и АВКΔ32 показано на рис. 1. Результаты исследования интактного вируса АВК с помощью тритиевой планиграфии опубликованы нами ранее [3]. Для определения распределения метки вдоль полипептидной цепи интактного БО АВК и его укороченного варианта были выделены и проанализированы все пептиды – продукты гидролиза трипсином, кроме трёх коротких пептидов: Т6, Т7, Т21, и части Т11 (рис. 1).

Величины удельной радиоактивности остатков были скорректированы с учётом соответствующих коэффициентов [30] для пропорциональности их доступным площадям. Построение гистограммы в процентах от общей удельной радиоактивности ($A_{уд}, \%$) или в значениях удельной радиоактивности, нормированных на один или несколько (33–36 а.о.) поверхностных, находящихся рядом с сайтом протеолиза остатков, давало схожие резуль-

таты. Как видно из рис. 1, распределение тритиевой метки в интактных вирионах АВК и АВКΔ32 заметно отличается.

В БО АВКΔ32 по сравнению с интактным АВК значения удельной радиоактивности остатков 66–73, 141–146, 161–175, 233–247 возрастали, а остатков 122–138, 184–191, 195–200 – уменьшались (рис. 1). Для того чтобы понять, в каких областях пространственной структуры БО происходят эти изменения, мы использовали имеющуюся трёхмерную структуру БО УВК, близкого гомолога АВК. Первичные структуры БО АВК и УВК имеют значительное сходство: 64% идентичных и 91% подобных остатков (из 237 остатков БО) [5]. Последовательность *N*-концевого домена в БО АВК на 2 остатка длиннее, чем в БО УВК. Трёхмерная структура БО УВК (PDB ID: 6HXX, остатки 44–267), полученная крио-ЭМ с разрешением 0,34 нм, включала три домена: *N*-концевой домен (I), остатки с 44 до 77; центральный домен (II), остатки с 78 по 225; и *C*-концевой домен (III), остатки с 226 до 267 (рис. 2). Домен I выступал из центрального домена и в структуре, полученной с помощью

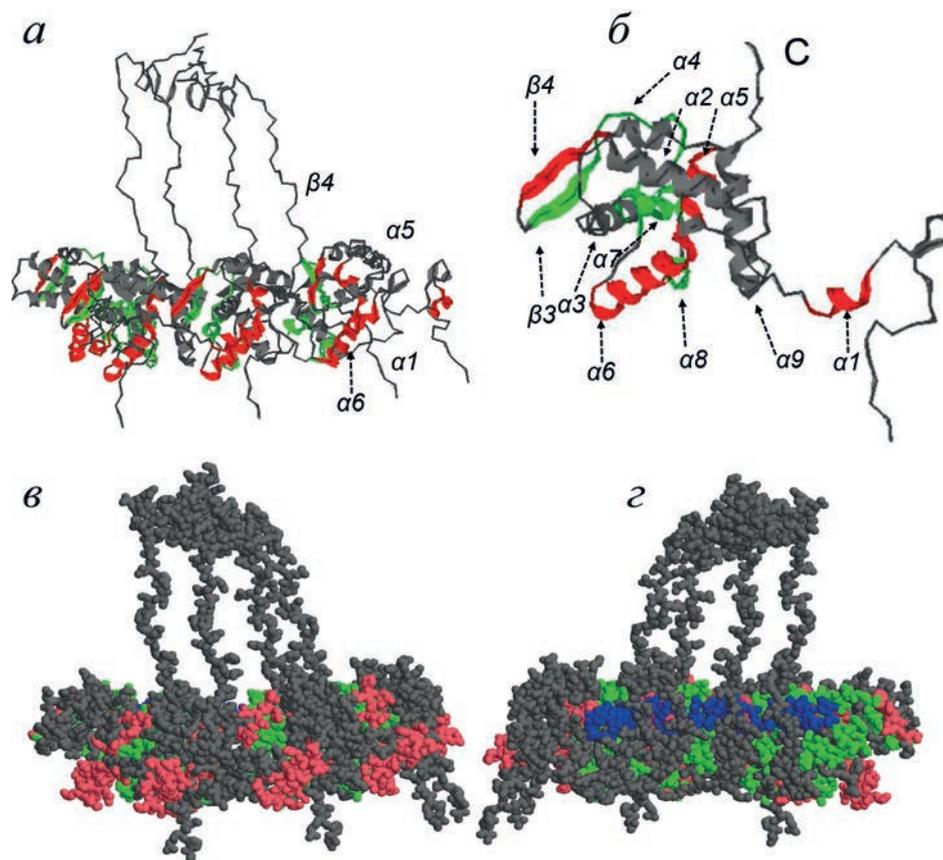


Рис. 2. Относительное изменение радиоактивности в элементах вторичной структуры белков вирионов АВК при удалении ΔN -пептида. Области со значением $A_{АВК\Delta 32}/A_{АВК} > 1,8$ показаны красным, $< 0,5$ – зелёным. *a* – Фрагмент, состоящий из 4 субъединиц; *б* – фрагмент, состоящий из одной субъединицы (спирали представлены в виде ленты), *с* – *C*-конец БО; *в*, *г* – показано 4 субъединицы (приведён скелет структуры) снаружи и изнутри вириона соответственно; РНК отмечена синим цветом (*г*)

Распределение тритиевой метки по элементам вторичной структуры БО вирионов АВК и АВКΔ32 и доступная площадь СН-поверхности, рассчитанная с помощью программы GROMACS 5,1 на модели YVK (PDB: 6HXX)

Элемент вторичной структуры	№ остатков	Число остатков	Суммарная радиоактивность элемента, А ^а , %		Относительное изменение, А ^б	Доступная площадь СН-поверхности элемента, S ^с , нм ²		Доля недоступной СН-поверхности, S ^б
			АВКΔ32	АВК		А _{АВКΔ32} /А _{АВК}	БО YVK	
<i>l1</i>	33–59	33	18,7	24,8	0,8	9,2	5,2	0,43
<i>β1,2</i>	60–65	6	3,3	4,1	0,8	2,7	1,9	0,28
<i>α1</i>	68–74	7	6,1	2,0	3,0	3,3	2,2	0,31
<i>l2</i>	75–87	13	4,2	5,1	0,8	4,6	2,5	0,45
<i>α3*</i>	119–124	5	0,8	2,4	0,3	0,8	0,5	0,42
<i>l4</i>	125–132	8	2,0	4,3	0,5	2,0	1,1	0,41
<i>β3</i>	133–138	6	1,7	3,9	0,4	2,0	1,0	0,51
<i>β4</i>	141–146	6	6,8	3,4	2,0	2,0	1,4	0,30
<i>α4</i>	147–154	8	6,2	9,4	0,7	1,9	1,5	0,23
<i>α5</i>	157–163	7	3,0	1,4	2,2	0,9	0,6	0,34
<i>α6</i>	165–180	16	16,8	8,9	1,9	4,9	2,3	0,52
<i>α7</i>	184–191	8	1,8	3,3	0,5	2,3	1,1	0,50
<i>α8</i>	195–200	6	1,6	5,3	0,3	1,0	0,8	0,20
<i>l5</i>	201–211	11	2,6	2,3	1,1	1,7	1,3	0,27
<i>α9</i>	212–228	17	3,5	4,4	0,8	7,5	3,3	0,56
<i>C-</i>	229–267	39	15,7	11,5	1,4	20,4	9,6	0,53

Примечания. ^а Суммарную радиоактивность элемента оценивали путём сложения радиоактивности всех аминокислот, входящих в состав элемента.

^б Значения $A_{\text{АВК}\Delta 32}/A_{\text{АВК}} > 1,8$ и $(S_{\text{БО YVK}} - S_{\text{YVK}})/S_{\text{БО YVK}} > 0,43$ подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

^с Суммарную доступную площадь СН-поверхности элемента (см. ниже) рассчитывали с помощью программы GROMACS 5,1 путём сложения доступной площади всех аминокислот элемента.

* Данные для спирали *α2* и части *α3* отсутствуют.

крио-ЭМ, охватывал домен II двух соседних БО. Атомные координаты остатков 1–43 не были определены, предположительно из-за разупорядоченности и подвижности. Высокая идентичность первичных структур БО вирусов АВК и YVK позволила использовать модель БО YVK (PDB: 6HXX) для моделирования строения белковой оболочки АВК.

Нами рассчитано включение тритиевой метки (в % от общей радиоактивности) в элементы вторичной структуры белка [4] для вирионов АВК и АВКΔ32, которое представлено в таблице.

В таблице рассчитана суммарная радиоактивность элемента (А) в частицах АВКΔ32 и АВК, приведено относительное изменение радиоактивности $A_{\text{АВК}\Delta 32}/A_{\text{АВК}}$. Из таблицы видно, что при удалении N-концевого фрагмента БО в АВКΔ32 возрастает доступность тритию спиралей *α1* (68–74 а.о.), *α5* (157–163 а.о.), *α6* (165–180 а.о.) и *β4*-тяжа (141–146 а.о.). Одновременно снижается доступность тритию фрагмента *α3-l4-β3* (119–138 а.о.) и спиралей *α7* (184–191 а.о.), *α8* (195–200 а.о.). Относительное изменение радиоактивности вириона в элементах вторичной структуры белка

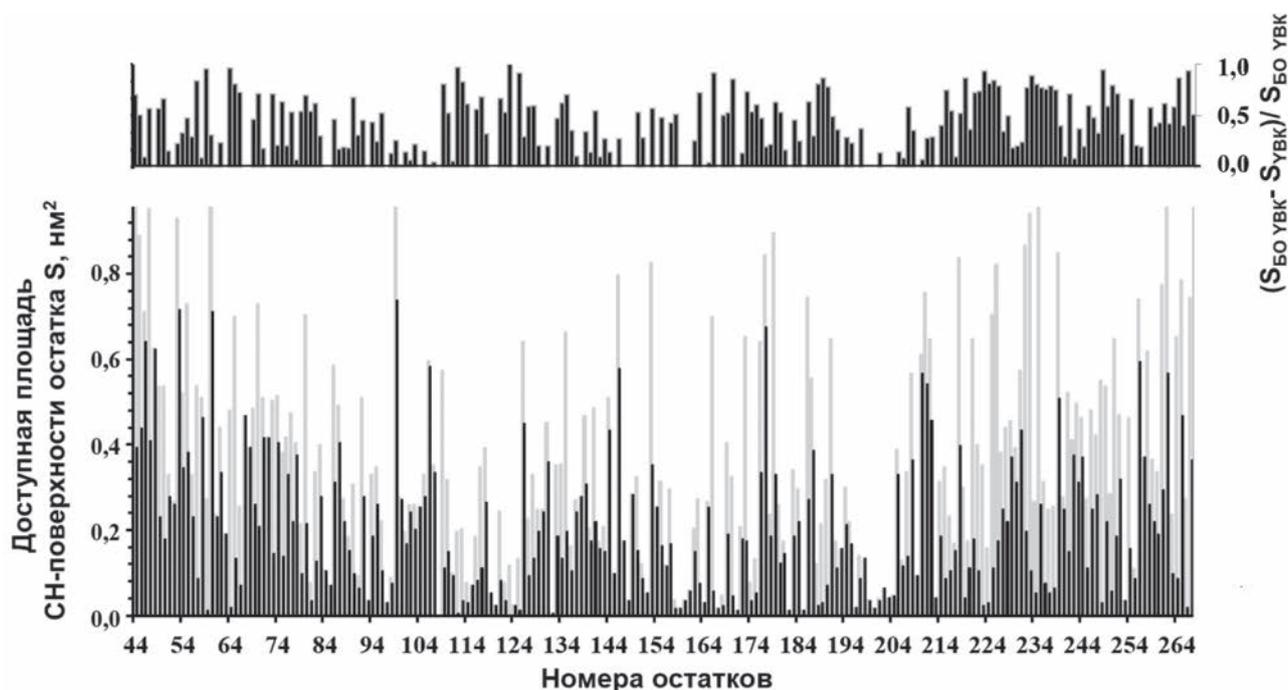


Рис. 3. Расчёт доступной СН-поверхности для БО в свободном виде, $S_{\text{БО YVK}}$ (серые столбики), и в составе вириона, S_{YVK} (чёрные столбики), в nm^2 . На вставке приведена величина $(S_{\text{БО YVK}} - S_{\text{YVK}}) / S_{\text{БО YVK}}$ — доля поверхности остатков, относящихся к углеводородным фрагментам, которые экранированы в составе вириона (правая шкала) — областям межсубъединичных и межвитковых контактов БО в составе вириона

при удалении ΔN -пептида продемонстрировано на трёхмерной модели БО YVK (PDB: 6HXX) двумя цветами для лучшей визуализации (рис. 2). Фрагменты структуры, в которых доступность тритию возрастает, показаны красным цветом; фрагменты, где доступность тритию снижается, показаны зелёным цветом.

Обращает на себя внимание тот факт, что увеличение метки при удалении ΔN -пептидов наблюдается на поверхности вириона (рис. 2, в). В поверхностный домен I (33–79 а.о.) вирионов АВК Δ 32 и АВК включалось 34% и 25% всей тритиевой метки соответственно. Это свидетельствует об экранировке домена I ΔN -пептидом. ΔN -Пептид интактного АВК был наиболее меченым участком БО, содержал 22% всей метки и составлял 12% от длины БО. Тритиевая метка незначительно включалась также во внутренние слои вириона (рис. 2, г), что предполагало проникновение атомов трития через межсубъединичные контакты и/или иные каналы в вирионе. При удалении ΔN -пептида наблюдалось уменьшение метки внутри вириона (рис. 2, г), что указывало на происходящую структурную перестройку, приводящую к компактизации вириона.

Расчёты доступной поверхности БО в вирионе YVK и в свободном виде. Для определения межсубъединичных и межвитковых элементов

структуры БО и дополнительной оценки полученных экспериментальных данных были проведены расчёты доступной поверхности аминокислотных остатков БО в вирионе и в свободном виде на модели YVK, исходя из данных крио-ЭМ-структуры (PDB: 6HXX). Вычисления проводились с помощью программы GROMACS 5,1 [29], использующей алгоритмы, основанные на подходе Ли и Ричардса [31]. Поверхность молекулы определяется как её часть, доступная растворителю, молекула которого представляется в виде сферы. Размеры атомов макромолекулы определяются их Ван-дер-Ваальсовыми радиусами. В вычислениях использовали одну свободную субъединицу БО и часть вирусной частицы, состоящую из 70 БО (8 витков). Для сравнения экспериментальных данных тритиевого мечения вириона АВК с расчётными данными мы использовали сферу с радиусом трития 0,09 нм, определённым ранее [17]. Доступную поверхность определяли только у атомов углерода, связанных хотя бы с одним атомом водорода (СН-поверхность).

Результаты расчёта доступной СН-поверхности представлены на рис. 3 для БО в свободном виде, $S_{\text{БО YVK}}$, и в составе вириона, S_{YVK} .

Суммарная доступная площадь СН-поверхности свободного белка составляет $81,6 \text{ nm}^2$, а белка в вирионе — $44,9 \text{ nm}^2$. Таким образом,

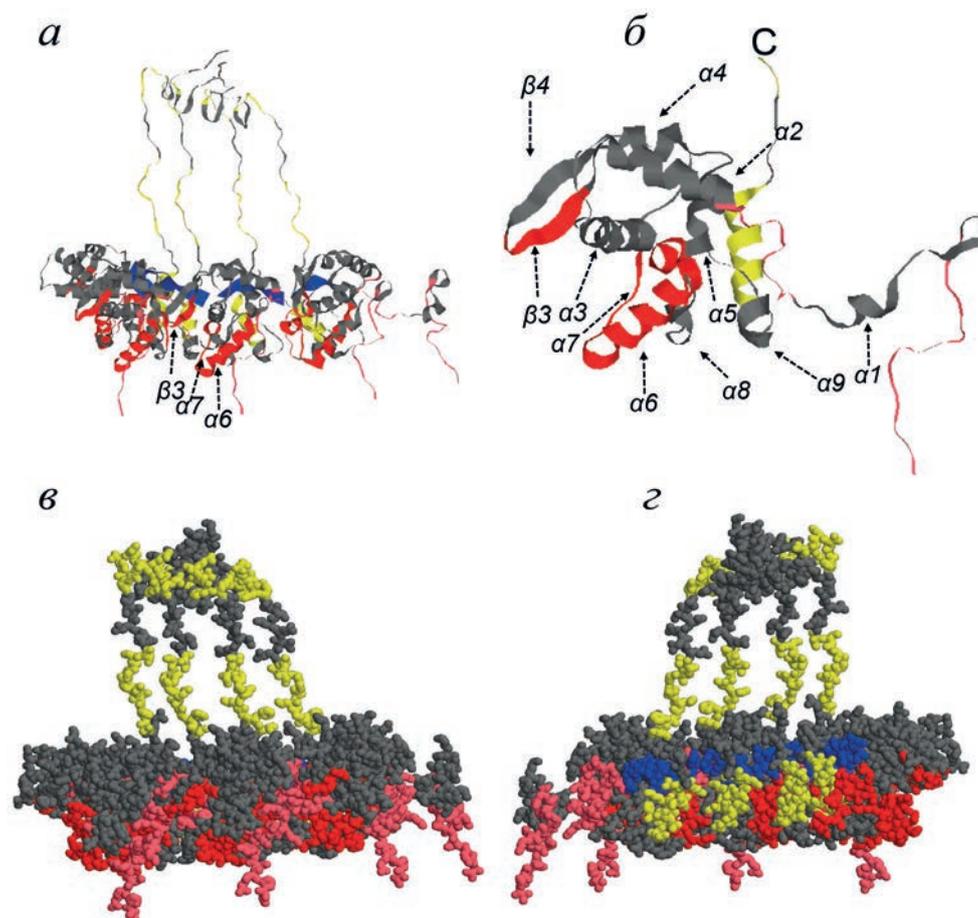


Рис. 4. Относительное изменение доступной площади СН-поверхности в элементах вторичной структуры в свободном белке и во фрагменте вириона из 70 молекул БО. Участки, для которых значения $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}})/S_{\text{БО УВК}} > 0,43$, показаны красным/жёлтым цветом. *a* – Приведён фрагмент, состоящий из 4 субъединиц, *б* – фрагмент, состоящий из одной субъединицы, С – С-конец БО; *в*, *г* – показано 4 субъединицы снаружи и изнутри вириона соответственно; РНК показана синим цветом (*a*, *г*)

45% ($36,7 \text{ nm}^2$) поверхности БО образуют контакты между субъединицами в вирионе (без учёта 43 *N*-концевых остатков).

Относительное изменение доступной площади СН-поверхности в элементах вторичной структуры в свободном белке и вирионе продемонстрировано на трёхмерной модели БО УВК (рис. 4, таблица). Фрагменты поверхностного домена I и центрального домена II, в которых возрастает площадь СН-поверхности (рис. 4, *a–в*), показаны красным цветом. Увеличение доступности внутри вириона в С-доме показано жёлтым цветом (рис. 4, *г*). В таблице рассчитаны суммарные площади СН-поверхности элементов вторичной структуры, *S*, в свободном белке и вирионе, а также доля недоступной СН-поверхности вириона, $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}})/S_{\text{БО УВК}}$. Из таблицы видно, что в свободном белке, по сравнению с вирионом, почти в два раза больше доступная СН-поверхность петель *11* и *12*, принадлежащих поверхностному домену I, $\beta 3$ -тяжа и спиралей

а6 и *а7*, что подтверждает их расположение в месте контакта БО с соседним витком.

Обращает на себя внимание значительная доступная СН-поверхность спирали $\alpha 9$ и С-конца, расположенных в сердцевине вириона (таблица), что подтверждает наличие каналов/полостей в вирионе, который оказался частично проницаемым и для атомов трития (рис. 1).

Таким образом, увеличение тритиевой метки при удалении ΔN -пептида вируса АВК в элементах $\alpha 1$ и $\beta 4$ показывает экранирование ΔN -пептидом поверхностного домена I и части центрального домена II, а мечение спирали $\alpha 6$ свидетельствует о частичном экранировании межвитковой зоны поверхности соседних субъединиц и расположении ΔN -пептида над этими участками структуры БО. Уменьшение метки внутри вириона при удалении ΔN -пептида вируса (рис. 2, *г*) предполагает возможную структурную перестройку, приводящую к компактизации вириона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было обнаружено, что *N*-концевые домены БО потивирусов располагались на поверхности вириона [3, 4, 12] и содержали значительную долю неупорядоченных участков [1, 2]. *N*-Концевые пептиды потивирусов были наиболее иммунодоминантными и генерировали вирусспецифические антитела [32]. В процессе жизнедеятельности потивирусы взаимодействуют со многими различными белковыми и мембранными компонентами растительных клеток, и наличие значительной доли неупорядоченных последовательностей в БО может быть одним из факторов их высокой биологической эффективности [33]. ΔN -Домен включает большое число (~70%) гидрофильных (9 T/S/N/Q/G) и заряженных (13 E/D/K/R) остатков и относительно малое число гидрофобных/алифатических остатков (10 I/L/V/A), что и определяло склонность к структурным переходам и могло быть причиной аномалий в КД-спектре и электрофоретической подвижности [1]. Оказалось, что ΔN -домены БО АВК участвуют в сборке вирусоподобных частиц (ВПЧ), и часть их неструктурированных сегментов приобретает β -структуру [34, 35].

В нашей работе было показано, что ΔN -пептид (а.о. 1–32) экранировал остатки 66–73, 141–146 и входящие в межвитковую область остатки 161–175 БО АВК. Уменьшение метки внутри вириона при удалении ΔN -пептида вируса (рис. 2, з) приводило к образованию более компактной спирали вируса. Наблюдаемое изменение мечения во фрагментах БО после трипсинолиза не может быть следствием элиминирования дефектных вирионов. Об этом говорит несущественное изменение концентрации вируса и сохранение величины соотношения E_{260}/E_{280} (~1,25) препаратов после трипсинолиза (см. Материалы и методы). Ранее по результатам анализа КД-спектров нами было показано, что при удалении ΔN -пептида вторичная структура молекул БО в составе вириона практически не меняется. Однако по данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и других методов в вирионе АВК при удалении ΔN -пептида происходили изменения четвертичной структуры [5], сопровождающиеся уменьшением шага спирали белковой оболочки, уменьшением гибкости и возрастанием стабильности частиц, что подтверждает наши данные. Известно, что спиральность структуры вириона частично обуславливается спиральностью расположенной внутри вириона

РНК, так как сборка БО УВК в отсутствие РНК приводит к формированию неспиральных ВПЧ в виде стопки дисков [4]. Кроме того, БО поти- и потексвирусов [7] взаимодействует с РНК в консервативных положениях (для АВК это S127, R159, D203). Расчёт на модели вириона УВК (рис. 3) показал низкую доступность их СН-поверхности (0,02–0,09 нм²) для сферической пробы с радиусом трития, и мы также наблюдали низкую радиоактивность этих остатков как в интактном АВК, так и в АВК Δ 32 (рис. 1), что дополнительно подтверждает правомерность использования модели вириона УВК в нашей работе.

Тритиевая метка незначительно включалась также во внутренние слои вириона (рис. 2, з), что предполагало миграцию реакционноспособных атомов трития через межсубъединичные контакты или каналы в вирионе, заполненные водным раствором. Возможность этого явления обсуждалась ранее [16, 17]. Атомы трития проникали между углеводородными цепями липидов в липосомах [36] или пурпурных мембранах с бактериородопсином [37] без существенной потери их энергии.

Серия биохимических и биофизических исследований икосаэдрических вирусов показала, что их вирусные капсиды образуются путём динамической самосборки белков и подвергаются контролируемым конформационным переходам с изменением поверхностных структур для выполнения различных биологических функций [38]. У некоторых спиральных вирусов также обнаружена структурная гетерогенность. Так, среди частиц вирионов гордеи-вируса штриховатой мозаики ячменя [39] обнаружены «широкие» и «узкие» частицы с 22,2 и 21,2 субъединицами на виток. Ряд работ свидетельствовал о наличии нескольких функциональных и структурных состояний у вирионов потексвируса X-вируса картофеля [28, 40, 41]. Анализ вирионов потивируса ВМТу методом крио-ЭМ показал, что вирионы растягиваются и сжимаются с амплитудой около 0,22 нм, и были обнаружены частицы с шагом спирали 3,42–3,61 нм [7]. Удаление *N*-концевого пептида БО АВК приводило к уменьшению шага спирали вириона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе показано, что *N*-концевой пептид (ΔN -пептид) на поверхности вириона АВК экранирует поверхностный домен I, часть центрального домена II и межвитковую зону на поверхности соседних субъединиц. Удаление

ΔN -пептида вызывало снижение доступности внутренних областей вириона и приводило к образованию более компактной спирали вируса. Мы предполагаем, что часть поверхностного ΔN -пептида располагается между витками спирали вириона. Это увеличивает шаг спирали и обеспечивает большую гибкость вириона, что важно для функционирования вируса. Понимание структурных особенностей гибких фитовирусов и роли N -концевых доменов их белков необходимо для создания и использования вирусных и вирусоподобных наночастиц в качестве платформ для презентации эпитопов и разработки вакцин [42].

Вклад авторов. А.Л. Ксенофонтов, Л.А. Баратова — концепция и руководство работой; А.Л. Ксенофонтов, Г.А. Бадун, Н.В. Федорова,

П.И. Семенюк — проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; А.Л. Ксенофонтов, Л.А. Баратова, Г.А. Бадун — написание и редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы благодарят за полезную дискуссию и обсуждение работы доктора химических наук Э.В. Штыкову (Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова).

Финансирование. Работа выполнена частично при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00525а).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., Rumvolt, R., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., and Dobrov, E. N. (2013) Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A, *PLoS One*, **8**, e67830, doi: 10.1371/journal.pone.0067830.
2. Charon, J., Theil, S., Nicaise, V., and Michon, T. (2016) Protein intrinsic disorder within the *Potyvirus* genus: from proteome-wide analysis to functional annotation, *Mol. BioSystems*, **12**, 634-652, doi: 10.1039/c5mb00677e.
3. Baratova, L. A., Efimov, A. V., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Hunt, R., Badun, G. A., Ksenofontov, A. L., Torrance, L., and Jarvekulg, L. (2001) In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment, *J. Virol.*, **75**, 9696-9702, doi: 10.1128/JVI.75.20.9696-9702.2001.
4. Kezar, A., Kavcic, L., Polak, M., Novacek, J., Gutierrez-Aguirre, I., Znidaric, M. T., Coll, A., Stare, K., Gruden, K., Ravnikar, M., Pahovnik, D., Zagar, E., Merzel, F., Anderluh, G., and Podobnik, M. (2019) Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein, *Sci. Adv.*, **5**, eaaw3808, doi: 10.1126/sciadv.aaw3808.
5. Shtykova, E. V., Petoukhov, M. V., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Skurat, E. V., Kordyukova, L. V., Moiseenko, A. V., and Ksenofontov, A. L. (2021) The structure of the potato virus A particles elucidated by small angle X-ray scattering and complementary techniques, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 230-240, doi: 10.1134/S0006297921020115.
6. Zamora, M., Mendez-Lopez, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavin, J. L., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M. A., and Valle, M. (2017) Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses, *Sci. Adv.*, **3**, eaao2182, doi: 10.1126/sciadv.aao2182.
7. Cuesta, R., Yuste-Calvo, C., Gil-Carton, D., Sanchez, F., Ponz, F., and Valle, M. (2019) Structure of Turnip mosaic virus and its viral-like particles, *Sci. Rep.*, **9**, 15396, doi: 10.1038/s41598-019-51823-4.
8. Agirrezabala, X., Mendez-Lopez, E., Lasso, G., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M., and Valle, M. (2015) The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses, *eLife*, **4**, e11795, doi: 10.7554/eLife.11795.
9. DiMaio, F., Chen, C. C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y. H., Lin, N. S., and Egelman, E. H. (2015) The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 642-644, doi: 10.1038/nsmb.3054.
10. Tatineni, S., Kovacs, F., and French, R. (2014) Wheat streak mosaic virus infects systemically despite extensive coat protein deletions: identification of virion assembly and cell-to-cell movement determinants, *J. Virol.*, **88**, 1366-1380, doi: 10.1128/JVI.02737-13.
11. Jarvekulg, L., Baratova, L., Dobrov, E., Badun, G., Hunt, R., Andreeva, E., Rabenstein, F., Efimov, A. V. (2000) Study of the spatial structure of potato virus. A coat protein subunits and particles using tritium planigraphy, *Beiträge Züchtungsfors.*, **6**, 61-66.
12. Shukla, D. D., Thomas, J. E., McKern, N. M., Tracy, S. L., and Ward, C. W. (1988) Coat protein of potyviruses. 4. Comparison of biological properties, serological relationships, and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y, *Arch. Virol.*, **102**, 207-219, doi: 10.1007/BF01310826.

13. Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D., and Pirone, T. P. (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids, *J. Gen. Virol.*, **76**, 265-270, doi: 10.1099/0022-1317-76-2-265.
14. Harrison, B. D., and Robinson, D. J. (1988) Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **321**, 447-462, doi: 10.1098/rstb.1988.0102.
15. Goldanskii, V. I., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Baratova, L. A., and Grebenshchikov, N. I. (1988) The use of thermally activated tritium atoms for structural-biological investigations: the topography of the TMV protein-accessible surface of the virus, *J. Mol. Biol.*, **201**, 567-574, doi: 10.1016/0022-2836(88)90638-9.
16. Баратова Л. А., Богачева Е. Н., Гольдманский В. И., Колб В. А., Спириин А. С., Шишков А. В. (1999) *Тритиевая планиграфия биологических макромолекул*, Наука, Москва.
17. Badun, G. A., and Fedoseev, V. M. (2001) Permeability of lipid membranes for atomic tritium or atom "slipping" effect and its role in tritium planigraphy, *Radiochemistry*, **43**, 301-305, doi: 10.1023/A:1012872927896.
18. Badun, G. A., and Chernysheva, M. G. (2023) Tritium thermal activation method. Features of application, modern achievements, and further development prospects, *Radiochemistry*, **65**, 185-197, doi: 10.1134/S1066362223020054.
19. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (1997) Proteins on ribosome surface: measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12892-12897, doi: 10.1073/pnas.94.24.12892.
20. Dobrov, E. N., Badun, G. A., Lukashina, E. V., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Fedoseev, V. M., and Baratova, L. A. (2003) Tritium planigraphy comparative structural study of tobacco mosaic virus and its mutant with altered host specificity, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3300-3308, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03680.x.
21. Baratova, L. A., Grebenshchikov, N. I., Dobrov, E. N., Gedrovich, A. V., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Efimov, A. V., Jarvekulg, L., Radavsky, Y. L., and Saarna, M. (1992) The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building, *Virology*, **188**, 175-180, doi: 10.1016/0042-6822(92)90747-d.
22. Shishkov, A. V., Goldanskii, V. I., Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Zhirnov, O. P., and Galkin, A. V. (1999) The *in situ* spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7827-7830, doi: 10.1073/pnas.96.14.7827.
23. Ksenofontov, A. L., Kozlovskii, V. S., Kordiukova, L. V., Radiukhin, V. A., Timofeeva, A. V., and Dobrov, E. N. (2006) Determination of concentration and aggregate size in influenza virus preparations using the true UV-absorption spectra [in Russian], *Mol. Biol.*, **40**, 172-179.
24. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
25. Goodman, R. M. (1975) Reconstitution of potato virus X *in vitro*. I. Properties of the dissociated protein structural subunits, *Virology*, **68**, 287-298, doi: 10.1016/0042-6822(75)90272-x.
26. Tsugita, A., and Scheffler, J. J. (1982) A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 585-588, doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06634.x.
27. Trofimova, L., Ksenofontov, A., Mkrtychyan, G., Graf, A., Baratova, L. A., and Bunik, V. I. (2016) Quantification of rat brain amino acids: Analysis of the data consistency, *Curr. Anal. Chem.*, **12**, 349-356, doi: 10.2174/1573411011666151006220356.
28. Lukashina, E., Ksenofontov, A., Fedorova, N., Badun, G., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., and Dobrov, E. (2012) Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in *Potato virus X* virion stability and functional activity, *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 38-45, doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00725.x.
29. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, **1-2**, 19-25, doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
30. Gedrovich, A. V., and Badun, G. A. (1992) Study of the spatial structure of globular proteins by tritium planigraphy. Short peptides as a model of a fully extended polypeptide chain [in Russian], *Mol. Biol.*, **26**, 558-564.
31. Lee, B., and Richards, F. M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.*, **55**, 379-400, doi: 10.1016/0022-2836(71)90324-x.
32. Shukla, D. D., Tribbick, G., Mason, T. J., Hewish, D. R., Geysen, H. M., and Ward, C. W. (1989) Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8192-8196, doi: 10.1073/pnas.86.21.8192.
33. Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberte, J. F., Hong, J., Nelson, R. S., and Wang, A. (2010) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication, *J. Virol.*, **84**, 799-809, doi: 10.1128/JVI.01824-09.
34. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvolt, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., and Dobrov, E. N. (2016) Heating-induced transition of Potyvirus

- Potato Virus A coat protein into beta-structure, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **34**, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
35. Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Golanikov, A. E., Jarvekulg, L., and Shtykova, E. V. (2018) Structure of potato virus A coat protein particles and their dissociation [in Russian], *Mol. Biol.*, **52**, 1055-1065, doi: 10.1134/S0026898418060101.
36. Kordyukova, L. V., Ksenofontov, A. L., Badun, G. A., Baratova, L. A., and Shishkov, A. V. (2001) Studying liposomes by tritium bombardment, *Biosci. Rep.*, **21**, 711-718, doi: 10.1023/a:1015572321508.
37. Shishkov, A. V., Ksenofontov, A. L., Bogacheva, E. N., Kordyukova, L. V., Badun, G. A., Alekseevsky, A. V., Tsetlin, V. I., and Baratova, L. A. (2002) Studying the spatial organization of membrane proteins by means of tritium stratigraphy: bacteriorhodopsin in purple membrane, *Bioelectrochemistry*, **56**, 147-149, doi: 10.1016/s1567-5394(02)00018-x.
38. Chakravarty, A., Reddy, V. S., and Rao, A. L. N. (2020) Unravelling the stability and capsid dynamics of the three virions of brome mosaic virus assembled autonomously *in vivo*, *J. Virol.*, **94**, doi: 10.1128/JVI.01794-19.
39. Clare, D. K., Pechnikova, E. V., Skurat, E. V., Makarov, V. V., Sokolova, O. S., Solovyev, A. G., and Orlova, E. V. (2015) Novel inter-subunit contacts in barley stripe mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy, *Structure*, **23**, 1815-1826, doi: 10.1016/j.str.2015.06.028.
40. Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Arkhipenko, M. V., and Atabekov, J. G. (2003) Linear remodeling of helical virus by movement protein binding, *J. Mol. Biol.*, **333**, 565-572, doi: 10.1016/j.jmb.2003.08.058.
41. Lukashina, E., Badun, G., Fedorova, N., Ksenofontov, A., Nemykh, M., Serebryakova, M., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., and Dobrov, E. (2009) Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of *Potato virus X* induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions, *FEBS J.*, **276**, 7006-7015, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07408.x.
42. Steele, J. F. C., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Marsian, J., Meshcheriakova, Y., and Lomonosoff, G. P. (2017) Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **9**, e1447, doi: 10.1002/wnan.1447.

CHANGES IN THE STRUCTURE OF POTATO VIRUS A VIRIONS DURING LIMITED PROTEOLYSIS *in situ* ACCORDING TO TRITIUM LABELING DATA AND COMPUTER SIMULATION

A. L. Ksenofontov^{1*}, L. A. Baratova¹, P. I. Semenyuk¹, N. V. Fedorova¹, and G. A. Badun²

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

² *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

The coat proteins (CP) of potato virus A virions (PVA) contain partially disordered N-terminal domains, which are necessary for performing vital functions of the virus. A comparative analysis of the structures of coat proteins (CPs) in intact PVA virions and in virus particles lacking the N-terminal 32 amino acids (PVA Δ 32) was carried out in this work based on the tritium planigraphy data. Using the atomic resolution structure of the potato virus Y potyvirus (PVY) protein, which is a homolog of CP PVA, the available CP surfaces in the PVY virion were calculated and the areas of intersubunit/ interhelix contacts were determined. For this purpose, the approach of Lee and Richards (Lee, B., and Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 379-400) was used. Comparison of the incorporation profiles of the tritium label in intact and trypsin-degraded PVA Δ 32 revealed the position of the Δ N-peptide shielding the surface domain (a.a. 66-73, 141-146) and the interhelix zone (a.a. 161-175) of the PVA CP. The presence of channels/cavities was found in the virion, which turned out to be partially permeable to tritium atoms. Upon removal of the Δ N-peptide, a decrease in the label within the virion (a.a. 184-200) was also observed, indicating a possible structural transition leading to virion compactization. Based on the data obtained, we can conclude that part of the surface Δ N-peptide is located between the coils of the virion helix, which increases the helix pitch and provides greater flexibility of the virion, which is important for the intercellular transport of the viruses in the plants.

Keywords: potyviruses, coat protein, potato virus A, N-terminal disordered domains, structural modeling, tritium planigraphy